

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Adéla Říhová

Epigenetická regulace genů pro HLA II. třídy ve vztahu ke stárnutí organismu.
Epigenetic regulation of HLA class II genes in relation to senescence of organism.

Diplomová práce

Školitel: Ing. Anna Katarzyna Kotrbová - Kozak, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlašuji:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2015

.....

Bc. Adéla Říhová

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. MUDr. Marii Černé. Csc. za možnost podílet se na velmi zajímavém projektu a také své školitelce Ing. Anně Kotrbové- Kozak, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady během tvorby diplomové práce.

Děkuji také svým kolegům z laboratoře za rady, pomoc a vytvoření přátelského prostředí. Speciální dík patří Mgr. Martě Zajacové za nikdy nekončící trpělivost při zodpovídání dotazů a za uvedení do nehostinného světa statistické analýzy.

Poděkování patří mému manželovi a dceři za milující domov, ve kterém se práce mohla zrodit. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a nejbližším přátelům za veškeré formy podpory.

Abstrakt

Úvod: Glykoproteiny hlavního histokompatibilního systému (MHC) jsou nezastupitelnými spoluúčastníky regulace imunitní odpovědi a udržování imunitní homeostázy. Regulace jejich exprese hraje důležitou roli v adaptivní imunitní odpovědi. V poslední době je velmi zkoumaným mechanismem této regulace metylace DNA v regulačních oblastech, které jsou klíčové pro dostupnost DNA transkripčním faktorům. Stárnutí organismů je mimo jiné spojováno se změnami v metylaci DNA. Zvýšená predispozice k imunosenescenci ve stáří by mohla být následkem právě změn v metylačním stavu regulačních oblastí genů MHC II. třídy.

Cíle: Cílem této práce je analýza metylačního stavu regulační oblasti genu *DQB1* a porovnání rozdílů mezi generacemi a jednotlivými alelami. Dále je porovnána úroveň exprese mRNA genu *DQB1* mezi generacemi a mezi jednotlivými alelami.

Metody: Z krve dárců tří různých věkových skupin byly izolovány DNA a RNA. DNA byla genotypizována a modifikována bisulfitovou konverzí. Dále byly amplifikovány regulační oblasti genů *DQB1* a byly klonovány do bakterií. Pozitivní klony byly selektovány a podrobeny metylační analýze. RNA byla přepsána do cDNA pomocí reverzní transkripce a její relativní úroveň exprese byla určena pomocí kvantitativní PCR.

Výsledky: Mezigenerační analýza intronu 1 ukázala statisticky významný rozdíl v metylaci alely 06:02, která je u dětí více metylována než u lidí středního věku. Mezialelová porovnání v rámci jedné skupiny se povedlo statisticky potvrdit u intronu 1 dětí. Alela 05:01 je metylována ve větší míře než alela 06:03. Intron 2 Alely 05:03 je méně metylován než 05:01. Lidé ve středním věku mají intron alely 06:02 méně metylován oproti alelám 06:03 a 03:01 a podobný trend byl nalezen u seniorů, intron 1 alely 05:01 metylován ve větší míře než 06:02. Porovnání jednotlivých metylačních míst v rámci jedné alely jsme statisticky potvrdily v pozicích 1298, 1621, 1661, 2248 pro alelu 06:02. Tato alela je na těchto pozicích více metylována u dětí než u lidí ve středním věku. Na pozici 1706 je alela 06:02 u dětí více metylována než u lidí ve středním věku ale i než u seniorů. Pokud se blíže podíváme na alelu 05:01 v pozicích 1511, 1517, 1563 a 1575 je u seniorů metylace vyšší než u dětí. Analýza relativní úrovně exprese ukázala vyšší expresi alely 06:02 než 02:02 a 03:01 a potvrdila menší míru metylace alely 06:02 u seniorů oproti lidem ve středním věku.

Klíčová slova: HLA II. třídy, HLA *DQB1*, epigenetika, regulace exprese, metylace DNA, stárnutí

Abstract

Introduction: Glycoproteins of the major histocompatibility complex (MHC) are an irreplaceable part of immune response regulation and immune homeostasis maintenance. The regulation of the expression plays an important role in adaptive immune response. Recently, DNA methylation in regulatory areas, crucial for DNA availability to transcription factors, is one of the most researched mechanisms of this type of regulation. The DNA methylation is, among others, related to the aging processes. Increased predisposition age-related immunosenescence in higher age could result from the changes in methylation status of regulatory areas of MHC class II genes.

Aims: The aim of this thesis is to analyze the methylation status of regulatory areas of *DQB1* gene and to compare the differences between generations and specific alleles. The differences in the levels of *DQB1* gene mRNA transcription between generations and specific alleles is also compared.

Methods: Both DNA and RNA were isolated from blood samples obtained from donors of three different age groups. DNA was genotyped and modified by bisulfite conversion. The regulatory areas of *DQB1* genes were then amplified and subcloned into bacteria. The positive clones were selected and subjected to DNA methylation analysis. RNA was reverse transcribed into cDNA and its relative level of expression was determined by quantitative PCR.

Results: The intergeneration analysis of intron 1 showed statistically significant difference in methylation of allele 06:02 which appears to be methylated more in children compared to mid-age individuals. Interallelic comparison inside separate groups was statistically proven for intron 1 in children. The allele 05:01 is methylated more prominently than allele 06:03. Intron 2 of allele 05:03 is methylated less than in allele 05:01. The mid-age group exhibited lesser methylation in allele 06:02 intron compared to alleles 06:03 and 03:01, similar trend was observed in senior group for allele 06:02 intron 1 compared to allele 05:01. The comparison of specific methylation sites inside given allele was statistically confirmed for sites 1298, 1621, 1661 and 2248 in allele 06:02. This allele appears to be methylated more in these sites in children, compared to mid-age individuals. Compared both to mid-age and senior individuals, this allele also exhibits stronger methylation in children in 1706 site. Closer examination of allele 05:01 discovered stronger methylation in children in sites 1511, 1517, 1563 and 1575, compared to senior group. The relative level of

expression analysis showed higher expression of allele 06:02 compared to alleles 02:02 and 03:01 and lower level of methylation in allele 06:02 for seniors individuals in comparison to mid-age group.

Keywords: HLA class II, HLA DQB1, epigenetics, expression regulation, DNA methylation, aging

Seznam zkratek

APC	antigen prezentující buňka
CDR	complementarity determining regions
CIITA	class II transactivator
CLIP	class II associated li peptid
CREB	cyclic AMP responsible element- binding protein
DNMT	DNA metyltransferáza
ERAD	ER-associated protein degradation
FDC	folikulární dendritická buňka
GWAS	genome-wide association study
HDAC	histondeacetyláza
HDM	histone demetyláza
HLA	lidský leukocytární antigen
HMT	histon metyltransferáza
HP1	heterochromatinový protein
HSP	heat shock protein
ISRE	interferon-stimulated response element
JmJC	Jumonji C
LSD1	lysine specific demethylase 1
MBD	methyl-CpG binding domain
MBP	methyl-CpG binding protein
MHC	Hlavní histocompatibilní komplex
NK	natural killer
PLC	peptid loading complex
RCLB	red cell lysis buffer
RISC	RNA induced silencing complex
ROS	reactive oxigen species
SAM	S-adenosylmethionin
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	T buněčný receptor
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRD	transcription repression domain
WCLB	white cell lysis buffer

Obsah:

1	Úvod.....	11
2	Literární úvod.....	12
2.1	Hlavní histokompatibilní systém (MHC).....	12
2.1.1	Genový komplex HLA	12
2.1.2	Struktura a funkce HLA molekul	16
2.1.3	Regulace exprese HLA genů:.....	20
2.1.4	Nomenklatura HLA.....	22
2.1.5	Polymorfismus MHC molekul	22
2.2	Epigenetika.....	24
2.2.1	Metylace DNA	24
2.2.2	Metylace a acetylace na histonech.....	28
2.2.3	Vliv prostředí a epigenetické změny.....	30
2.2.4	RNA interference a sRNA	31
2.3	Senescence.....	31
2.3.1	Imunosenescence	34
2.3.2	Epigenetické změny během stárnutí	36
2.3.3	MHC molekuly a stárnutí	40
3	Cíle práce	42
4	Materiál.....	43
4.1	Pufry, roztoky a komerční soupravy	43
4.2	Použité přístroje	49
4.3	Seznam počítačových programů	50

5	Metody a postup práce.....	51
5.1	DNA analýza	51
5.1.1	Izolace chromozomální DNA.....	51
5.1.2	Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	52
5.1.3	HLA genotypizace.....	52
5.1.4	TBE agarózová elektroforéza	54
5.1.5	Bisulfitová konverze DNA	55
5.1.6	Amplifikace produktu pomocí nested PCR	57
5.1.7	Izolace a přečištění PCR produktu	59
5.1.8	Přidávání koncového adenylu a přečištění.....	60
5.1.9	Klonování	61
5.1.10	Izolace plasmidové DNA	64
5.1.11	Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleázami.....	66
5.1.12	Sekvenace	67
5.2	RNA analýza.....	67
5.2.1	Izolace RNA	67
5.2.2	Reverzní transkripce	68
5.3	Statistická analýza	70
6	Výsledky	72
6.1	Genotypizace HLA molekul	72
6.2	Analýza metylačního stavu regulační oblasti <i>HLA DQB1</i>	72
6.2.1	Porovnání celkového metylačního stavu alel <i>HLA DQB1</i>	73
6.2.2	Porovnání metylačního stavu jednotlivých CpG míst <i>DQB1</i> alel	76
6.3	Analýza úrovně exprese mRNA genu <i>DQB1</i>	78
6.3.1	Porovnání rozdílu relativní úrovně exprese mRNA jednotlivých alel	79

6.3.2	Korelace relativní úrovně exprese mRNA genu <i>DQB1</i> a metylačního stavu promotoru.....	82
7	Diskuze	84
8	Souhrn.....	87
9	Seznam literatury.....	88
10	Přílohy..... <u>Chyba! Záložka není definována.</u> 103	

1 Úvod

Jedním z hlavních mechanismů, kterým tělo ovlivňuje úroveň genové exprese, jsou epigenetická regulace. Za mechanismy epigenetické regulace považujeme metylace DNA, modifikace histonů a RNA interference. V regulačních oblastech může vlivem metylace DNA docházet zabránění vazby transkripčního faktoru na DNA, nebo zprostředkování vazby reprimujících faktorů na DNA.

Stárnutí organismu je definováno celou řadou změn postihujících imunitní systém, genom a mimo jiné je asociováno se změnami v metylaci DNA. S přibývajícím věkem se zvyšuje nestabilita genomu, kvůli ubývání metylace v intergenových oblastech. Nejen intergenové oblasti se mění ve stáří, změny metylace postihují také regulační oblasti genu. Tento trend byl prokázán u mnoha promotorů zvýšenou úrovní metylace CpG ostrovů.

HLA geny hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi, jsou prezentovány na povrchu antigen prezentujících buněk v komplexu s exogenními peptidy CD4+ T lymfocytům. HLA II. třídy jsou esenciální pro iniciaci adaptivní imunity, jsou zapojeny v selekci T buněčného repertoáru a aktivaci efektorových T lymfocytů. Změny v regulaci exprese těchto genů mají velké dopady na imunitu. Rozdíl v metylaci regulačních oblastí MHC II. třídy se zdají jednou z příčin rozvoje imunosenescence ve stáří.

Stárnutí organismu nemusí být jediný důvod pro změny v expresi HLA genů. Regulační oblasti těchto genů jsou vysoce polymorfní a zdá se, že tento polymorfismus funguje pro exprese alel v různých hladinách. Je pravděpodobné, že i metylace DNA se bude lišit mezi regulačními oblastmi jednotlivých alel.

2 Literární úvod

2.1 Hlavní histokompatibilní systém (MHC)

Objev lidského leukocytárního antigenu (human leukocyte antigens, HLA) se datuje mezi roky 1952-1958. V těchto letech Jean Dausset vyslovil hypotézu a následně prokázal, že stejný antigenní systém nalezený u myši existuje i na povrchu lidských leukocytů. Za tyto zásluhy byl v roce 1980 Dausset oceněn Nobelovou cenou. Po objevení hlavního histokompatibilního systému (major histocompatibility complex, MHC) nastal obrovský rozvoj v jeho typizaci a to hlavně pro potřeby transplantací. Bylo prokázáno, že MHC je velmi důležitý pro přijetí štěpu hostitelem, kde hlavní roli hraje shoda HLA dárce a příjemce (Carosella, 2009; Dausset, 1981).

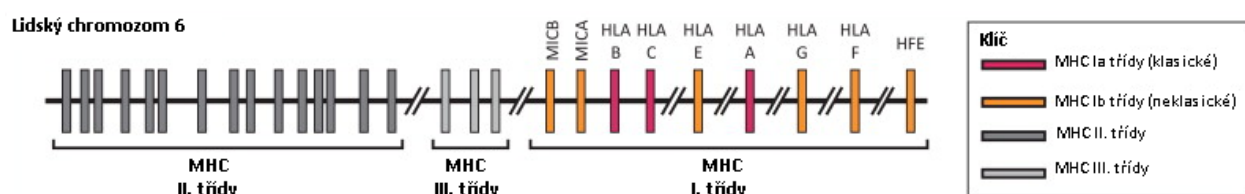
Geny HLA patří mezi hlavní asociované s chorobami. Příčinou asociace je vysoká míra polymorfismu MHC molekul. Nejprve byly s onemocněními spojovány spíše MHC glykoproteiny I. třídy, ale s rozvojem GWAS (genome-wide association study) bylo potvrzeno, že rizikovějším faktorem jsou molekuly MHC II. třídy. MHC glykoproteiny II. třídy utváří repertoár T lymfocytů v thymu, prezentují exogenní peptidy CD4+ T buňkám a udržují centrální toleranci (Xing a Hogquist, 2012; Johnson a O'Donnell, 2009). Krom velkého polymorfismu je pro genový komplex HLA typická tzv. vazebná nerovnováha. Geny jsou preferenčně děděny jako konzervované bloky. Z tohoto důvodu je obtížné určit, které alely přímo ovlivňují predispozice ke vzniku nemoci, a které alely jsou s nimi asociovány pouze sekundárně (Müller-Hilke a Mitchison, 2006; Kim 2005).

2.1.1 Genový komplex HLA

Lidský MHC se nachází na krátkém raménku šestého chromozomu. Tento genový komplex je rozdělen do tří regionů: HLA II. třídy (centromerická oblast), HLA I. a HLA III. třídy (telomerická oblast). HLA I. třídy obsahuje klasické izotypy HLA-A, HLA-B a HLA-C a neklasické HLA-E, HLA-F, HLA-G, MICA a MICB (Obr. 1). Do HLA II. třídy patří klasické izotypy HLA-DR, HLA-DP a HLA-DQ a neklasické HLA-DM a HLA-DO a mimo jiné také TAP geny (Obr. 2).

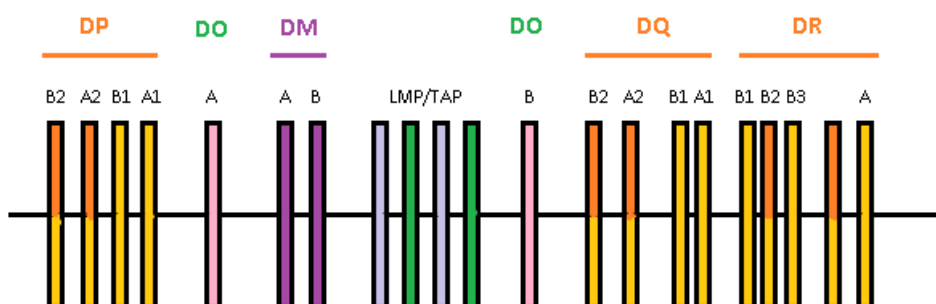
Tento segment DNA je dlouhý přibližně 3,6 Mb a obsahuje více než 200 genů a patří k nejpolymorfnějším oblastem lidského genomu (Mack a kol., 2013; Mungall a kol., 2003).

HLA antigeny jsou transmembránové molekuly náležící do imunoglobulinové superrodiny. Účastní se prezentace antigenních peptidů imunitnímu systému. Na chromozom 6p21 patří kromě MHC I. a II. třídy také III. třída kódující cytokiny (tumor necrosis factor, TNF), složky komplementu (C2, C4a, C4b, properdín, faktor B), molekulární chaperony (heat-shock proteins, HSP-70) a enzym 21- hydroxylázu. Pro každý z genů I. a II. třídy existuje mnohotná alelie. Jednotlivé alely MHC se liší ve struktuře vazebného místa a tím i schopností vázat peptidy (Černá, 2008).



Obr. 1: Genomická mapa lidského MHC (upraveno podle Elmer and McAllister, 2012).

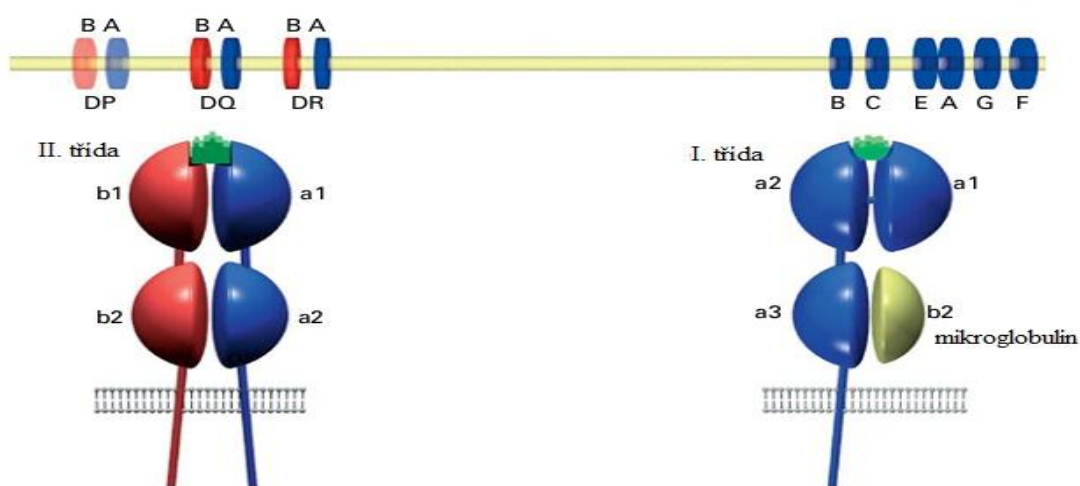
Komplex HLA se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu. Pořadí jednotlivých tříd HLA je barevně znázorněné a popsáno v klíči vedle obrázku.



Obr. 2: Schématická mapa regionu MHC II třídy. Na obrázku jsou znázorněny hlavní geny, především geny klasické druhé třídy (žluté). Pseudogeny jsou žluto-oranžové. Geny náležící k neklasickým MHC II. třídy jsou ružové (DO) a tmavě fialové (DM). Geny, které se podílejí na zpracování antigenu pro MHC I. třídy, jsou fialové a zelené.

MHC glykoproteiny první třídy se vyskytují na všech jaderných buňkách a zahrnují jak klasické lokusy A, B a C, tak i neklasické lokusy E, F a G. Každý lokus kóduje jeden α řetězec

(molekulární hmotnost 45 kDa) tvořený řadou exonů a intronů. Locus se skládá jednak z variabilní části (exon 2 a 3 kódující $\alpha 1$ a $\alpha 2$ domény), která tvoří vazebné místo peptidu, jednak z konstantní části odpovídající $\alpha 3$ doméně (exon 4). K α řetězci se nekovalentně váže $\beta 2$ -mikroglobulin (12 kD) kódovaný patnáctým chromozomem (Obr. 3). Vazebný žlábek MHC molekul I. třídy je tvořen dnem z β skládaného listu a stěnami tvořenými α helixy. Vazebné místo peptidu kotví peptidy dlouhé 8-10 aminokyselin, které jsou rozpoznávány regiony (complementarity determining regions, CDRs) T buněčného receptoru (T-cell receptor, TCR)(Reboul a kol. 2012).



Obr. 3: Všeobecná struktura MHC glykoproteinů (Kim a Polychronakos, 2005). Ve vrchní části obrázku se nachází geny I. a II. třídy. Region I. třídy obsahuje geny A, B a C a II. třídy DP, DQ a DR. Každý α (červený) a β (modrý) řetězec je kódován sousedícími geny (HLA II. třídy).

Oproti MHC molekulám první třídy jsou MHC glykoproteiny II. třídy za normálních podmínek přítomny na antigen prezentujících buňkách (antigen presenting cell, APC). Tato oblast zahrnuje lokusy DR, DP a DQ, kde každý z nich kóduje dva samostatné peptidy: jeden α a jeden β řetězec. Každý gen obsahuje několik exonů a intronů. Největší je DR lokus obsahující deset genů a nejvíce polymorfním je DRB1 gen s 1196 alelami (Tab. 1). Alelické varianty DRB1 se vyskytují ve všech haplotypech, oproti tomu asi pětikrát méně se vyskytují formy DRB3 (58 alel), DRB4 (15 alel), DRB5 (20 alel). Ostatní geny, kam patří DRB2, DRB6,

DRB7, DRB8 a DRB9, jsou pseudogeny. Molekuly II. třídy tvoří heterodimer, který se skládá z α a β řetězce, obou zakotvených v membráně (Obr. 3). α řetězec je dlouhý přibližně 33-35 kDa a jeho gen obsahuje 5. exonů. Transmembránová část α řetězce a cytoplazmatický ocásek jsou kódovány 4. exonem, extracelulární domény jsou kódovány exony 2 a 3. DRA se vyskytuje pouze v 7 alelických formách (přičemž vazebná část peptidu není polymorfní) a slouží jako α řetězec pro DRB1, DRB3, DRB4 a DRB5. β řetězec je dlouhý přibližně 26-28 kDa a kóduje ho 6 exonů: 5. exon kóduje cytoplazmatický ocásek, 4. exon transmembránovou část a 2. a 3. exon extracelulární domény (Gene database dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Exon 2 genu DRB1 je velmi polymorfní, odpovídá doméně β 1 a vytváří vazebné místo jednak pro peptid (1. hypervariabilní oblast), jednak pro TCR (2. a 3. hypervariabilní oblast). Polymorfismus alfa (DQA1 49 alel, DQA2) i beta řetězce (DQB1 179 alel, DQB2) DQ molekul vymezuje vazebnou specifitu peptidu a má za následek až čtyři odlišné molekuly. Nejméně polymorfní jsou pak geny DPA1 (36 alel) a DPB1 (158 alel) (Robinson a kol., 2011).

Na krátkém raménku šestého chromozomu se mezi lokusy DQ a DP nachází TAP a LMP geny (Obr. 2). TAP1 a TAP2 geny kódují proteiny asociované s membránou, ty tvoří heterodimerní proteinové pumpy v membráně endoplasmatického retikula (ER). TAP transportéry pumpují degradované cytosolické peptidy z cytoplasmy do ER. LMP2 a LMP7 geny kódují podjednotky proteasomového komplexu, který se účastní tvorby antigenních peptidů v cytosolu. K HLA II. třídy patří i další geny: DOA, DOB, DMA a DMB (Tab. 1), které kódují α a β řetězce polypeptidu. Glykoproteiny HLA-DO a HLA-DM hrají roli v nakládání peptidů do vazebného žlábků MHC gp. II. třídy v intracelulárních vesikulech (Schulze a Wucherpfennig, 2011; Ramos a kol., 2009).

Tab. 1: Zastoupení alel jednotlivých genů HLA systému. V tabulce je číselně vyjádřen počet alel HLA I. a II. třídy. Nejpolymorfnější oblast regionu HLA I. třídy je *HLA-B*, za ním *HLA-A* a třetím je *HLA-C*. Méně polymorfní jsou geny *HLA-G*, *F* a *E*. V oblasti HLA II. třídy trojici nejpolymorfnějších okupuje *HLA-DRB* (mezi *DRB* alelami vítězí *DRB1*), *DQB1* a *DPB1*. Pro srovnání jsou uvedeny i non-HLA geny.

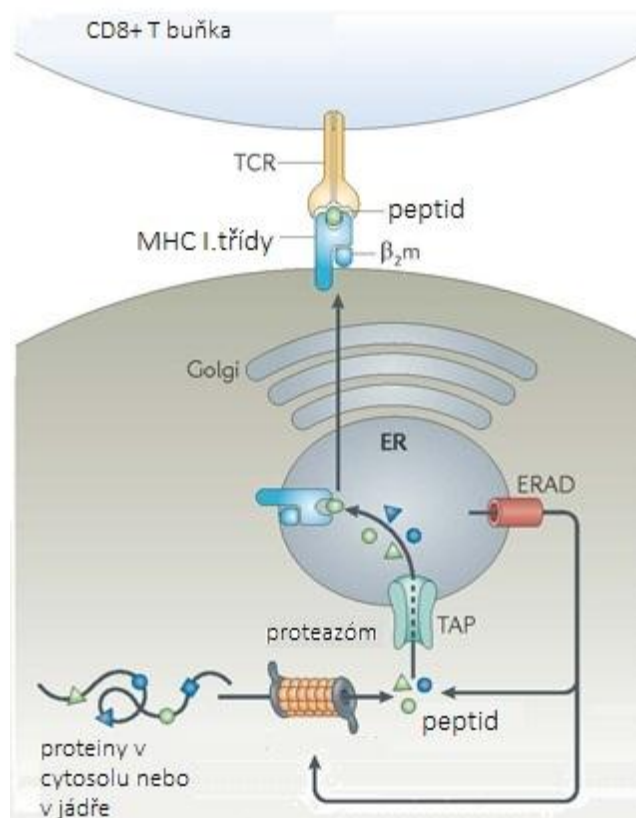
Počet HLA alel										
Alely HLA I. třídy										6725
Alely HLA II. třídy										1771
HLA alely										8496
Další non-HLA alely										148
HLA I. třídy										
gen	A	B	C	E	F	G				
alely	2132	2798	1672	11	22	50				
proteiny	1527	2110	1200	3	4	16				
HLA II. třídy										
gen	DRA	DRB	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1	DMA	DMB	DOA	DOB
alely	7	1297	49	179	36	158	7	13	12	13
proteiny	2	958	31	128	18	136	4	7	3	5
HLA II. třídy- DRB alely										
gen	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9	
alely	1196	1	58	15	20	3	2	1	1	
proteiny	887	0	46	8	17	0	0	0	0	
Další non-HLA geny										
gen	MICA	MICB	TAP1	TAP2						
alely	84	40	12	12						
proteiny	67	26	6	5						

(Převzato a upraveno z Robinson a kol., 2011)

2.1.2 Struktura a funkce HLA molekul

Molekuly HLA I. třídy jsou heterodimery tvořené těžkým řetězcem α a k němu nekovalentně vázaným β 2-mikroglobulinem. α řetězec sestává z α 3 (transmembránová konstantní doména), dále z α 2 a α 1 (variabilní doména), které jsou tvořeny 8 antiparalelními β -listy (dno vazebného žlábků) a dvěma α helixy (ohraničují vazebný žlábek). Takto vytvořené vazebné místo má pevné hranice, a proto může navázat peptidy dlouhé 8-10 aminokyselin (Goldberg a Rizzo, 2015; Hořejší a Bartůňková, 2009).

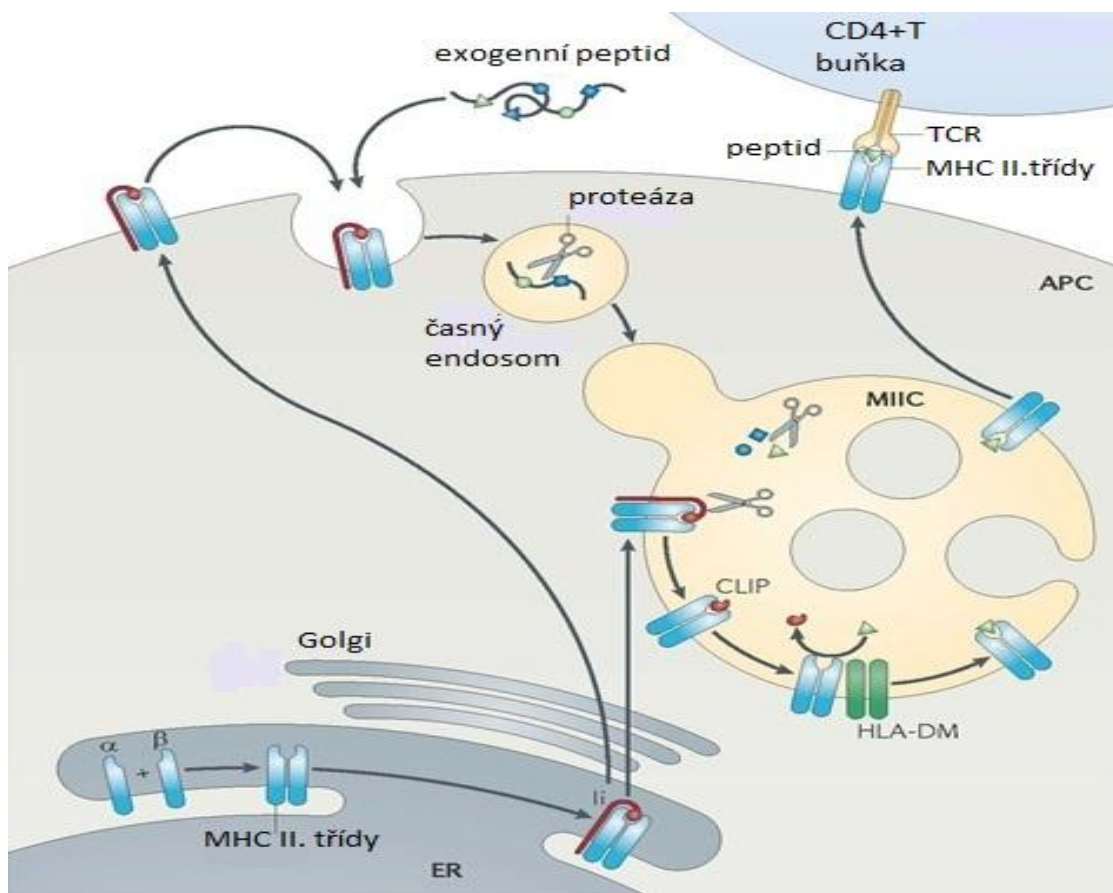
MHC glykoproteiny I. třídy jsou nápomocné při prezentaci endogenních peptidů CD8+ T lymfocytům a NK buňkám i když v některých případech jsou schopny prezentovat i exogenní peptidy (cross prezentace). Proteiny, které mají být na glykoproteiny navázány, jsou nejprve štěpeny v proteasomu. Takto vzniklé peptidy jsou navázány na HSP70 a HSP90, které navedou peptidy k transportéru v membráně endoplazmatického retikula. Transportér asociovaný s prezentací antigenu (transporter associated with antigen processing, TAP) se skládá z proteinů TAP1 a TAP2. Před navázáním z cytosolu přepravených peptidů na HLA I. třídy, dochází ke kompletaci α řetězce (asociovaného s molekulárním chaperonem calnexinem) s β 2-mikroglobulinem. Komplex α řetězce a β 2-mikroglobulinu uvolní calnexin a naváže se na komplex PLC (peptid loading complex) skládající se z tapasinu, calreticulinu a Erp57. Přes tapasin se přiblíží oba řetězce MHC glykoproteinu do bezprostřední vzdálenosti transportéru TAP v membráně ER (Obr. 4). Takto má glykoprotein zajištěný přísun proteinů z cytoplasmy. Po navázání peptidu na příslušný MHC I. se komplex uvolní z chaperonové mašinerie a je exportován přes Golgiho komplex na plazmatickou membránu (Rizvi a kol., 2011; Del Cid a kol., 2010; Rizvi a Raghavan, 2010).



Obr. 4: Prezentace endogenního antigenu MHC I. Třídy (převzato a upraveno z Groettrup a Schmidtke, 1999). Proteiny z cytosolu nebo z jádra jsou pomocí proteazómu děleny na peptidy. Takto upravené peptidy přepraví transportér asociovaný z prezentací antigenu (TAP) do endoplasmatického retikula (ER). V ER jsou peptidy naloženy na MHC glykoproteiny I. třídy (složené z α a $\beta_2\text{-m}$). Nenavázané peptidy mohou být recyklovány přes ERAD (ER associated protein degradation). Komplex MHC I. a peptidu je transportován přes Golgiho komplex na plazmatickou membránu, kde jsou rozpoznávány T buněčným receptorem (TCR) na CD8^+ T lymfocytech.

Oproti tomu se HLA II. třídy vyskytují jako heterodimery tvořené α a β řetězcem. Každý α a β řetězec se skládá ze dvou domén. $\alpha 1$ je variabilní doménou, která společně s variabilní doménou $\beta 1$ tvoří vazebné místo peptidu. $\alpha 2$ a $\beta 2$ jsou transmembránové domény. Stejně jako u MHC gp. I. třídy mají molekuly druhé třídy podobnou strukturu vazebného místa peptidu. Spodní část vazebného místa tvoří 8 antiparalelních β listů, které ohraničují dva α helixy. Vazebná rýha HLA II. třídy je otevřenější, což umožňuje vazbu peptidů dlouhých 5-35 aminokyselin (Hořejší a Bartuňková, 2009).

Molekuly II. třídy prezentují exogenní peptidy CD4⁺ T lymfocytům. Exogenní peptidy se přes endocytickou dráhu dostávají do kompartmentu MHC II. třídy (MIIC). Mezitím se v endoplazmatickém retikulu syntetizují těžký a lehký řetězec glykoproteinu II. třídy. Aby nedošlo k vazbě endogenního peptidu na molekuly HLA II. třídy, zablokuje vazebné místo peptidu invariantní řetězec (Ii). Takto vytvořený heterotrimer je exportován skrz Golgiho komplex do MIIC (Obr. 5). Zde se degradují pomocí proteáz jednak endocytované peptidy, jednak Ii, ze kterého ve vazebném žlábků zůstane jen fragment (class II associated Ii peptid, CLIP). Stejně jako při prezentování endogenních peptidů se i zde využívají chaperony. Patří mezi ně HLA-DM a DO. HLA-DM tvoří heterodimer zakotvený v membráně intracelulárních váček složený z α (HLA-DMA) a β (HLA-DMB) řetězce. Tyto chaperony jsou důležité pro odstranění CLIP, dále stabilizují prázdný vazebný žlábek MHC II. třídy a napomáhají následnému navázání exogenního peptidu. HLA-DO heterodimery nalezené v B buňkách (HLA-DOA a HLA-DOB) regulují navázání peptidu zprostředkované HLA-DM chaperony. Komplex MHC II. třídy s navázaným peptidem je transportován na plasmatickou membránu (shrnutí v Schulze a Wucherpfennig, 2012; Berger a Roche, 2009).



Obr. 5: Presentace exogenního peptidu HLA molekulami II. třídy (převzato a upraveno podle Neefjes a kol., 2011). V prvním kroku je do vazebného žlábků heterodimeru $\alpha\beta$ připojen invariantní řetězec (Ii), který brání vazbě peptidových fragmentů lokalizovaných v ER. Ii obsahuje dileucinový motiv, který směřuje HLA komplex do endocytotické dráhy. Buď přímo přes trans Golgiho aparát, nebo nepřímo přes internalizaci. Vazba peptidových fragmentů probíhá v kompartmentu nazývaném MIIC. Nejdříve je pomocí proteáz odštěpena část Ii, zbývající část zvaná CLIP (z angl. class II associated invariant chain peptide) zůstává nadále vázána na HLA II třídy. CLIP je poté v prostředí kyselého pH odštěpen proteolytickými enzymy a pomocí chaperonového proteinu HLA DM je zprostředkována výměna CLIPu za peptidový fragment. HLA DM tak v podstatě funguje jako rezervoár peptidových fragmentů a jelikož je strukturně podobný HLA II. třídy, zajišťuje dostatečnou vazebnou afinitu peptidového fragmentu.

2.1.3 Regulace exprese HLA genů:

Aktivace exprese HLA genů I. třídy je řízena několika konzervovanými regulačními promotorovými elementy: enhancerem A, ISRE (interferon-stimulated response element) a SXY modulem, který je společný i pro MHC II. třídy. V oblasti promotoru váže enhancer A NF- κ B a ISRE člena z rodiny interferon regulačních faktorů (IRF). Tyto transkripční

faktory zprostředkují genovou aktivaci IFN γ a TNF α , tím pádem i *MHC-I* transkripci (van den Elsen, 2011).

Exprese MHC II. třídy je velmi přísně regulována. Nadbytečná exprese vede často k těžkým autoimunitním chorobám a ztráta exprese může vyústit až v neschopnost reagovat na infekční agens. Oproti HLA molekulám první třídy, které se exprimují na všech jaderných buňkách se tyto glykoproteiny exprimují jen na omezeném počtu antigen prezentujících buněk. Patří mezi ně dendritické buňky, makrofágy, B lymfocyty, epiteliální buňky v thymu, které nepocházejí z kostní dřeně a jsou důležité pro selekci T buněk. Další nukleární buňky mohou exprimovat MHC II. třídy jen po adekvátním stimulu, kterým bývá IFN γ (Handunnetthi a kol., 2010).

Genová exprese je regulována především na úrovni transkripční pomocí regulačních sekvencí. Oproti klasickým sekvencím, mezi které patří TATA a CCAAT, mají MHC II. třídy další situované 150-300 pár bazí před místem iniciace transkripce. Od promotorů *MHC-I* se liší nepřítomností elementů ISRE a enhanceru A. Proximální promotor obsahuje tři konzervované regulační boxy S, Y, X (který je dále rozdělen na X a X2). Podle těchto boxů se celá regulační oblast nazývá SXY. Moduly SXY se vyskytují nejenom u klasických HLA molekul II. třídy, ale také u neklasických chaperonů DM a DO. V neposlední řadě je lze nalézt v promotorech genů invariantního řetězce. X a Y boxy jsou velmi konzervované, mnohem více než S box. Je zajímavé, že i přes to byla u genů DRB1, DQA1 a DQB1 v této oblasti nalezena polymorfní místa. Polymorfismy mohou ovlivnit expresi genů HLA a tím se podílet na autoimunitních procesech. Na regulační sekvence se váží specifické regulační či transkripční faktory: na X box nasedá regulační faktor X (RFX), X2 je místem pro CREB (cyclic AMP responsible element- binding protein) a nukleární transkripční faktor Y (NF-Y) se váže na Y box. Nasedání na regulační sekvence řídí trans-aktivátor II. třídy (class II transactivator, CIITA). CIITA patří do velké rodiny proteinů NLR (nucleotide binding domain, leucine-rich repeats containing). Exprese CIITA se shoduje s expresí MHCII molekul v antigen prezentujících buňkách (van den Elsen, 2011; Choi a kol., 2010; Seguí-Estévez a kol., 2009; Krawczyk a kol., 2008; Krawczyk a kol., 2004; Radosevich a Ono, 2003).

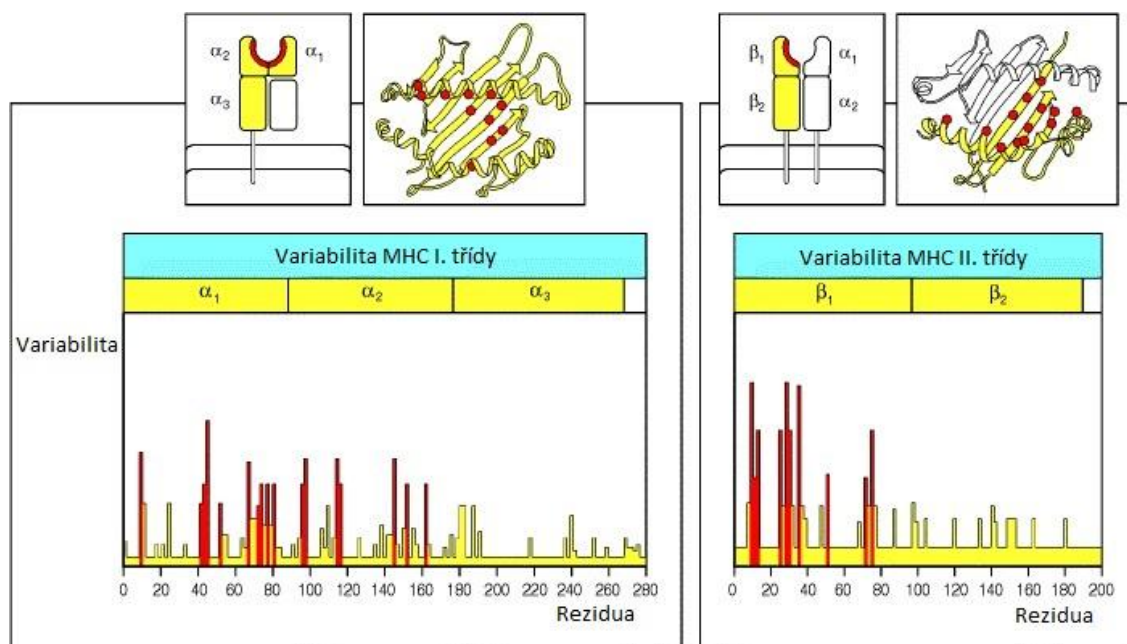
2.1.4 Nomenklatura HLA

Kvůli značnému polymorfismu HLA molekul bylo nutné zavést přesnou systematickou nomenklaturu. Komplikace v nomenklatuře byly způsobeny především častými změnami typizačních technik (které přinášely nové informace) a souběžným odkrýváním nových alel, potažmo celých lokusů.

Geny a jejich alely se označují jménem lokusu následovaném čtyřmi až osmi číslicemi (první čtyři číslice mají všechny alely, další čtyři se mohou přidat, pokud je to nezbytné). První dvě číslice odpovídají serologické specifitě příslušného genového produktu, další dvě pak jeho podtypu. Takto se dá rozlišit jen menší část variant molekul. Alely, jejichž čísla se neshodují ve dvou sadách, obsahují jednu nebo více nukleotidových substitucí, které mění sled aminokyselin v kódovaném proteinu. Alelám, které obsahují synonymní substituce a aminokyseliny se u nich nemění, je přiřazeno další dvojčíslí. Poslední sada číslic se přiřadí jen v případě polymorfismu alel v nekódujících oblastech (March, 2010; <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>).

2.1.5 Polymorfismus MHC molekul

Jak již bylo zmíněno dříve, MHC lokus je nejvíce polymorfní oblast lidského genomu. V lidské populaci je známo mnoho proteinů, které se objevují ve více genetických variantách. Taková diversita mezi proteiny se nazývá genetický polymorfismus. MHC proteiny se vyskytují ve více než 500 variantách, polymorfismus v takovém měřítku není znám u žádných jiných proteinů. Zastoupení jednotlivých alelických forem obou tříd glykoproteinů je zobrazeno v Tab. 1. Polymorfismus u MHC molekul se liší z hlediska tříd, kdy geny II. třídy jsou více polymorfní než I. třídy. Dokonce se liší i mezi jednotlivými řetězci, kde u MHC II. třídy je více polymorfní β řetězec a u MHC I. třídy je to α řetězec (Obr. 6). MHC polymorfismus se řídí potřebou co nejvíce rozšířit vazebnou diverzitu peptidů. Proto je nejvíce polymorfní oblast vazebného žlábků peptidu (Robinson a kol., 2011; Janeway a kol., 2001).



Obr. 6: Alelické variace na specifických místech uvnitř MHC molekul (Janeway a kol., 2001).

Variabilní místa (červená) vznikají z polymorfismu v amino-terminálních doménách α_1 a α_2 první třídy a α_1 β_1 domény druhé třídy. Tyto domény tvoří vazebné místo peptidu. Alelická variabilita se vyskytuje ve specifických místech ve vazebném žlábků, buď na dně rýhy, nebo na vnitřních stěnách ohraničujících vazebnou rýhu (na vnitřních stranách α helixů).

K tvorbě nových alel přispívá několik genetických mechanismů. Mezi tyto mechanismy neodmyslitelně patří tvorba bodových mutací (nejčastěji nesynonymní jednonukleotidové substituce ve vazebném žlábků peptidu), genová duplikace, kombinace sekvencí odlišných alel, buď genovou rekombinací, nebo genovou konverzí (Bade-Döding, 2011; Bollmer a kol., 2010; Balakrishnan a kol., 2010; Spurgin a Richardson, 2010).

Z evolučního hlediska to činí polymorfismus velmi výhodným, protože ovlivňuje nejen přežití ale i reprodukci. Existuje několik teorií, které vysvětlují vznik a udržení tak obrovského polymorfismu u HLA molekul:

- i. „patogenem“ řízená selekce. Patogeny mají snahu se všemožnými způsoby vyhnout detekci imunitním systémem nebo jeho následné reakci. Jednotlivé alelické formy prezentují odlišné složení peptidů, což znamená velmi malou pravděpodobnost, že se v populaci najde jedinec, který by nebyl schopný se proti určitému patogenu bránit.
- ii. Reprodukční selekce založená na toleranci matky a plodu. Plod je brán jako semiallogenní, kdy polovina fetálních genů je od otce. Pak záleží na kombinaci HLA-C

(které se exprimují na trofoblastu vedle HLA-E, F a G) alel otce a matky. Některé kombinace jsou náchylnější ke spontánním abortům než jiné. Vysoký polymorfismus je důležitý pro snížení pravděpodobnosti setkání rizikových alel.

- iii. Sexuální selekce zprostředkovaná MHC ovlivnitelnou volbou partnera. Ženy preferují muže, kteří mají odlišné MHC alely. Zaručí tak svým potomkům heterozygotní kombinaci MHC alel a tím pádem i vyšší procento peptidů prezentovaných na MHC molekulách (Ujvari a Belov, 2011; Eizaguirre a kol., 2009; Havlicek a Roberts, 2009; Hedrick a Thomson, 1988; Hviid, 2006).

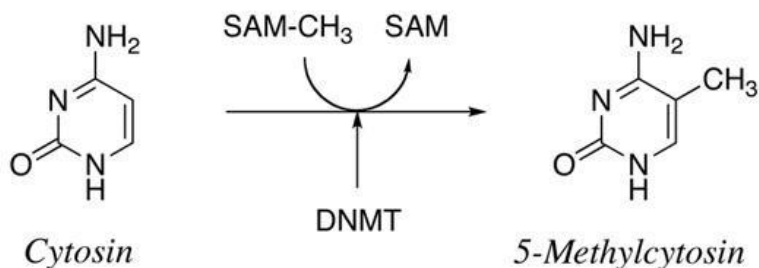
2 . 2 Epigenetika

Přenos dědičné informace organismu nemusí být vždy zprostředkován a kódován v nukleových kyselinách. Epigenetické mechanismy mohou ovlivnit fenotyp beze změny genotypu. Patří mezi ně hlavně změny v genové expresi a chromatinu, aniž by docházelo ke změnám sekvence DNA. Mezi epigenetické mechanismy patří například metylace DNA, kovalentní posttranslační změny histonů a silencing genů závislý na pomocné RNA. Mezi jednotlivými modifikacemi jsou úzké vztahy a dochází mezi nimi i k vzájemnému ovlivňování, což je nejvíce prozkoumáno u metylací DNA a acetylací a metylací histonů (Meaney, 2010; Cedar a Bergman, 2009, Vaissière a kol., 2008).

2.2.1 Methylace DNA

Methylace DNA je jedním z epigenetických mechanismů. DNA methylace je důležitá pro normální rozvoj u savců a mnoho pozorování ukazuje, že metylační status se mění především v různých patologických stavech (rakovina, autoimunitní choroby). Jedná se o kovalentní modifikaci DNA, zprostředkovanou enzymy DNA metyltransferázami (Obr.7). K metylaci u savců dochází na pátém uhlíku cytosinu v dinukleotidu CpG (cytosin-fosfát-guanin). Tyto dinukleotidy se nevyskytují v kódujících oblastech genu, ale v repetitivních sekvencích a CpG ostrůvcích. CpG ostrůvky jsou často součástí promotoru a obvykle jsou nemetylované. V lidském genomu se vyskytuje 56 miliónů CG míst a 60-80 % jich je metylovaných. Patříčná DNA methylace je nutná pro správný rozvoj organismu a zapojuje se v různých procesech, kam patří represe genů, imprinting, inaktivace X chromozomu

a karcinogeneze (Jurkowska a kol., 2011; Jin a kol., 2011; Turan a kol., 2010; Jones a Liang, 2009; Cedar a Bergman, 2009; Weber a kol., 2007).



Obr. 7: Konverze cytosinu pomocí DNA metyltransferázy (DNMT) na 5- metylcytosin (staženo a upraveno z http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/murrell.php).

DNMT katalyzuje přenos metylové skupiny (CH₃) z S-adenosil metyoninu na pátý uhlík cytosinu.

2.2.1.1 DNA-metyltransferázy

DNA-metyltransferázy (DNMT) jsou enzymy, které katalyzují přenos metylové skupiny na cytosin, kde donorem methylové skupiny je S-adenosil metyonin (Obr. 7). Skládají se z C terminální katalytické metyltransferázové domény a N terminální regulační domény. N terminální doména obsahuje vedoucí sekvenci lokalizující enzym do jádra a zprostředkovává interakce s dalšími proteiny, DNA a chromatinem (Chen a kol., 2013; Jurkowska a kol., 2011).

DNMT jsou obvykle děleny do dvou podtříd podle funkce a preference k substrátu. Do první skupiny patří *de novo* metyltransferázy, které upřednostňují nemetylované řetězce DNA. Po fertilizaci dochází k demethylaci genomu (kromě imprintovaných genů) a během raného embryonálního vývoje se metylace obnovuje a ustavují se metylační vzory. Mezi *de novo* metyltransferázy patří DNMT3a a DNMT3b. Tyto enzymy patří do rodiny DNA metyltransferáz spolu s DNMT3L. DNMT3a a DNMT3b pracují jako aktivní metyltransferázy pro ustavení DNA metylačních vzorů. Do *de novo* metyltransferáz se řadí díky preferenční vazbě k nemetylované DNA. DNMT3L náleží mezi katalyticky inaktivní, není schopen vázat kofaktor SAM a váže velmi slabě DNA. Funguje jako regulační faktor DNMT3a a DNMT3b. Interaguje s jejich katalytickými doménami a stimuluje jejich enzymatickou aktivitu tím, že umožní DNA a S-adenosil metioninu navázání a katalýzu. DNMT3a tvoří lineární heterotetramery společně s DNMT3L, které se stávají z dimeru DNMT3a obklopeného z obou

stran DNMT3L. Tento komplex má dvě aktivní místa pro DNA oddělená přibližně jedním obtočením DNA, což je přibližně 8-10 párů bazí. To umožňuje společnou metylaci CpG míst na opačných vláknech zároveň (Jurkowska a kol., 2011; Ha a kol., 2011; Lan a kol., 2010).

Druhá třída obsahuje DNMT1, která se řadí mezi hlavní DNA-metyltransferázy udržující DNA metylaci. DNMT1 se přednostně váže na hemimetylovanou DNA díky sekvenčně specifickým interakcím CpG s aktivním centrem enzymu. DNMT1 je odpovědná za znovu ustavení metylace po DNA replikaci. Odpovídá za zachování metylačních vzorů během buněčného dělení. Enzym „sedí“ na replikační vidličce a rychle metyluje/hemimetyluje CpG dinukleotidy a tím obnoví metylační vzory. „Udržující“ metyltransferáza interaguje s mnoha dalšími proteiny: histon deacetylázami (HDAC), DNMT3a, DNMT3b, různými transkripčními faktory, s DNA metyltransferázami asociovanými proteiny (Song a kol., 2012; Song a kol., 2010).

2.2.1.2 Metyl-CpG vazebné proteiny

Metyl-CpG vazebné proteiny patří do rodiny proteinů obsahujících methyl-CpG vazebnou doménu (methyl-CpG binding domain, MBD). Kombinují aktivitu jejich DNA vazebné domény a jiné katalytické nebo protein-protein vazebné domény. Všechny MBD proteiny mají metyl vazebnou doménu, která rozpoznává metylované CpG dinukleotidy. MECP2, MBD1 a MBD2 disponují TRD (transcription repression domain), která je zodpovědná za represi transkripce. Některé MBD proteiny mají metyltransferázovou aktivitu díky SET doméně (SETDB1 a SETDB2). Většina MBP je spojována s histondeacetylázami nebo histon metyltransferázami, tedy korepresory. Společně navozují represi transkripce (Lan a kol., 2010; Bogdanović a Veenstra, 2009; Du a kol., 2015).

Mezi MBD proteiny patří MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 a MeCP2. MBD1 se skládá z mnoha domén: samozřejmě N-terminální MBD (funguje jednak při vazbě na metylovanou DNA a jednak se účastní interakcí s dalšími proteiny), domény obsahující zinkové prsty (zprostředkovávají vazbu na nemetylovanou DNA) a C-terminální domény potlačující transkripci (transcriptional repression domain, TRD). MBD2 je schopný vázat metylovanou DNA a interaguje s NuRD komplexem (nucleosome remodelling and histone deacetylation komplex), který obsahuje například histon deacetylázy (HDAC1/2) a MBD3 (neschopný vázat metylovanou DNA). Histon deacetylázy jsou zodpovědné za sbalení chromatinu a tudíž mají

za následek represi transkripce. MBD4 může vázat metylovanou DNA a interagovat s jinými proteiny pomocí N-terminální MBD domény. C-terminální doména je odpovědná za DNA opravy. Jako jediný se MBD4 neúčastní represe transkripce. MECP2 se může vázat k metylované DNA a je díky interakcím s histon-deacetylázami schopný represe transkripce (Menafrá a Stunnenberg, 2014; Otani a kol., 2013; Georgel a kol., 2003; Bellacosa, 2001; Hendrich a kol., 1999; Zhang a kol., 1999; Hendrich a kol., 1998).

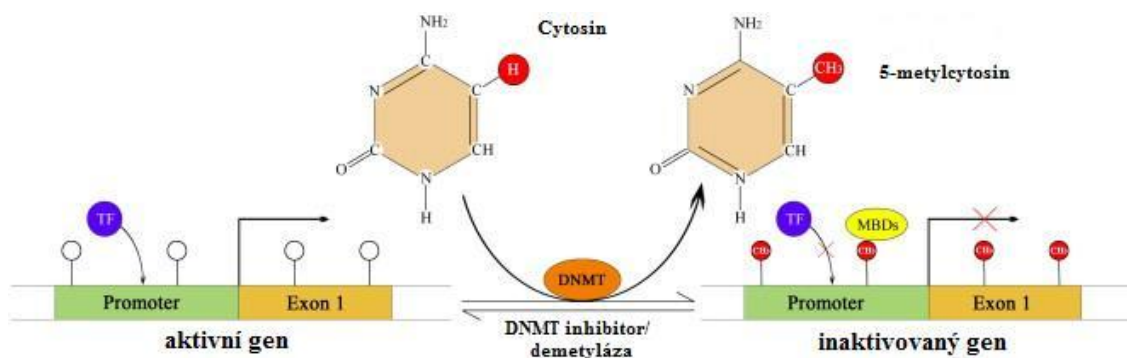
Protein Kaiso je výjimkou a neobsahuje MBD. Váže metylovanou DNA díky své doméně obsahující zinkové prsty. Interaguje s N-CoR represorovým komplexem, podporuje deacetylaci histonů a formaci potlačujících chromatinových struktur v cílových promotorech. Nejspíše přispívá k represi genů Wnt signální dráhy (Sasai a kol., 2010; Filion a kol., 2006).

2.2.1.3 Význam DNA metylace

Metylce DNA je především důležitá pro regulaci genové exprese a kondenzaci chromatinu. Patříčná DNA metylce je ale také nutná pro správný rozvoj organismu a zapojuje se v různých procesech, kam patří imprinting, inaktivace X chromozomu a karcinogeneze.

Regulaci iniciace transkripce nejvíce ovlivňuje metylce promotoru a prvního intronu daného genu (Obr. 8). Tato epigenetická regulace vede k blokování vazby transkripčních faktorů. Změny na DNA mají za následek represi transkripce cílového genu. Metylce v těle genu je důležitá pro snížení možnosti navázání RNA polymerázy a brání tak její schopnosti přepisovat cílové geny.

Umlčení exprese může být způsobeno nejenom samotnými DNA-metyltransferázami (a interakcí s histon-deacetylázami či histon-metyltransferázami), ale i kombinací s MBP, které vážou metylovanou DNA a blokují vazbu transkripčních faktorů.



Obr. 8: Methylace DNA vedoucí k následné represi transkripce (převzato a upraveno podle Zhou a Lu, 2008). DNA metyltransferáza (DNMT1) přenesla metylovou skupinu z S-adenosilmethioninu na cytosin v hemimetylovaných CpG a konzervuje metylační vzory. Proteiny obsahující metyl-CpG vazebnou doménu (MBD's) se vážou na metylované CpG a blokují vazbu transkripčních faktorů (TF). Tato vazba vede k represi transkripce. DNMT inhibitory nebo demethylázy jsou schopny odstranit metyl z 5- methylcytosinu a způsobit vazbu TF na promotor. Tato vazba vede naopak k reaktivaci transkripce.

2.2.2 Metylace a acetylace na histonech

Eukaryontní DNA je sbalena do struktury chromatinu, ten se může vyskytovat jako kompaktní a transkripčně neaktivní heterochromatin nebo rozvolněný transkripčně aktivní euchromatin. Chromatin je namotáván na oktamer tvořený čtyřmi histony (dimery H2A, H2B, H3 a H4). Omotáním 147 párů bazí (bp) kolem histonového oktameru vzniká nukleozom. Dva nukleozomy jsou od sebe odděleny vláknem dlouhým přibližně 20-80 bp a jsou pomocí histonu H1 stabilizovány do 30nm vlákna. Histony patří mezi bazické proteiny, obsahují větší množství kladně nabitých aminokyselin (arginin a lysin). DNA je oproti histonům záporně nabitá, záporný náboj DNA zesiluje interakce mezi histony a DNA. Jaderné histony (H2A, H2B, H3, H4) vystrkují C a N koncovou doménu z nukleozomu. Koncové domény často podléhají posttranslačním modifikacím: acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitinace a další. Posttranslační modifikace jsou důležité pro genovou transkripci, kondenzaci chromatinu a podílí se i na opravách a replikaci DNA (Woodcock a Ghosh, 2010; Segal a Widom, 2009; Barski a kol., 2007; Richmond a Davey, 2003).

Acetylace se odehrává na lysinových reziduiích N-terminálních konců histonů. Jedná se o reverzibilní modifikaci způsobenou acetyltransferázami (histone acetyltransferases, HAT), která se dá zvrátit působením histon-deacetyláz (histone deacetylases, HDAC). Acetylace neutralizuje pozitivně nabitá lysinová rezidua histonů, což snižuje afinitu histonů

k DNA. Způsobuje uvolnění histonů z nukleozomu a rozvolnění chromatinu a zpřístupní DNA pro transkripční faktory. Zatímco deacetylace histonů má za následek větší afinitu histonů k DNA, kondenzaci chromatinu a represi transkripce. K acetylaci dochází především na „core“ histonech H3 a H4 (Zentner a Henikoff, 2013; Molina-Serrano a Kirmizis, 2013; MacDonald a Howe, 2009; Ganesan a kol., 2009; Turner, 2000; Grunstein, 1997).

Metylací histonů narůstá bazicita a hydrofobicita ocásků histonů a afinita některých proteinů, transkripčních faktorů k DNA. Hlavními místy metylace uvnitř ocásků histonů jsou bazické postranní aminokyselinové řetězce reziduí lysinu a argininu. Methylace často probíhá na histonech H3 a H4 a jsou za ni zodpovědné histon-metyltransferázy (HMT). Existují tři třídy metyltransferáz histonů (Histone methyltransferase, HMT): metyltransferázy lysinů obsahující SET doménu, metyltransferázy lysinů neobsahující SET doménu a argininové metyltransferázy. Všechny společně využívají jako donor metylové skupiny S-adenosylmetionin (SAM). Cílem metyltransferáz je především změna aktivity genů, díky metylaci histonů a změně chromatinové struktury, ale jsou také cílem několika nehistonových proteinů. Na lysinové zbytky může být přidán jeden, dva ale i tři metylové skupiny, kdežto arginin může být mono- nebo dimetylován (symetricky nebo asymetricky). Methylace argininů je stejně jako acetylace histonů spojována spíše s aktivací transkripce. U metylace lysinů to takto jednoduché není. Často záleží na počtu přidaných metylových skupin a pozicích metylavoných lysinů. Metyltransferázy lysinů mají svou cílovou specifitu, často modifikují jeden lysin na jednom histonu, což může vést buď k aktivaci, nebo represi transkripce. H3 je metylován v pozicích K4, K9, K27, K36 a H4 v pozici K20 (Teperino a kol., 2010; Zee a kol., 2010; Fritsch a kol., 2009; Lachner a kol., 2003; Sims a kol., 2003; Rice a Allis, 2001).

Jako první byla objevena lysin specifická histon demetyláza (HDM), po které byly identifikovány další. Histon demetylázy jsou rozlišovány podle jejich demetylázových domén: LSD1 (lysine specific demethylase 1) a JmJc (Jumonji C). LSD1 je konzervovaný protein se substrátovou, FAD-vazebnou a aminooxidázovou doménou. Bývá součástí různých multiprotein komplexů, které zacílí LSD1 na mono- nebo dimetylované H3K9/K4. V závislosti na kontextu tyto změny vedou k aktivaci nebo represi transkripce. Proteiny obsahující JmJc doménu jsou transkripční koregulátory zapojené v demetylaci H3K9. Existuje dokonce

protein obsahující JmJc doménu, který má specifitu k H3R2me2 a H3R3me2, což vede k názoru, že i argininové metylační značky jsou reverzibilní (Teperino a kol., 2010; Mosammaparast a Shi, 2010).

2.2.3 Vliv prostředí a epigenetické změny

Epigenetické modifikace genomu umožní šíření stavů, kdy jsou geny aktivní, z jedné generace buněk do další. Protože jsou epigenetické změny reverzibilní, jsou lehce ovlivnitelné okolním prostředím. Dopadem pak může být rozvoj abnormálních fenotypů.

Strava jedince je nejdiskutovanější faktor prostředí ovlivňující epigenetické modifikace. Příkladem jsou studie dokládající vliv stravy březí Agoutí samice na epigenom potomka u myši Agouti. Genom těchto myši obsahuje imprintovaný gen, jehož produkt ovlivňuje tvorbu žlutého barviva. V těhotenství samičky, které dostávaly stravu bohatou na metyl, vykazovaly hypermetylaci imprintovaného genu. Ta vedla k změně barvy srsti a k prodloužení života. Hypometylace genu byla spojena s obezitou a náchylností k nádorům (Esteller, 2011; Cropley a kol., 2010; Wolff a kol., 1998).

Důležitými sloučeninami jsou metionin, cholin a folát, které jsou nezbytné pro syntézu SAM. Několik studií ukázalo, že složení stravy ovlivňuje dostupnost těchto faktorů a má za následek nedostatek donorů metylových skupin, čímž snižuje aktivitu metyl transferáz (Zeisel, 2012; Zeisel, 2010).

Další studie na monozygotických dvojčatech, které vstupují do života s epigeneticky srovnatelným podkladem, ukázaly velmi málo odlišností v brzkém věku, zato mnoho epigenetických změn v pozdějším věku (okolo 20% odlišností v DNA metylaci a acetylaci histonů). K rozdílům přispívá čas, který dvojčata nestrávila společně nebo také odlišná zdravotní péče (Tan a kol., 2013; Zhang a kol., 2012; Bell a Saffery, 2012; Haque a kol., 2009; Fraga a kol., 2005).

Mezi další environmentální faktory můžeme započítat působení toxinů. Změny v metylaci DNA mohou být způsobeny například kovy. Nikl, zinek, arzen a kadmium se řadí mezi inhibitory DNA metyltransferáz. U savců i krátké vystavení arzenu může mít dlouhodobé následky v hypometylaci DNA, snížení methyl transferázové aktivity a aktivaci protoonkogenů (Nohara a kol., 2011; Sciandrello a kol., 2004). Tyto studie naznačují, že

faktorů, které ovlivňují epigenetické modifikace je mnohem více, a je třeba se jimi dále zabývat.

2.2.4 RNA interference a sRNA

RNA interferencí (RNAi) je míněn biologický proces, při kterém dochází k inhibici genové exprese, především degradace mRNA (messenger RNA). K RNA interferenci dochází pomocí několika typů malé RNA. V různých organismech je schopná sRNA (small RNA) vyštěpená z dsRNA (double-stranded RNA) spustit epigenetický silencing genů v cytoplazmě a hraje důležitou roli při vývoji zvířat i rostlin. Takto vyštěpená sRNA může řídit degradaci komplementární mRNA a také metylaci homologní DNA sekvence, čímž zajišťuje transkripční genový silencing (Castel a Martienssen, 2013; Cuccato a kol., 2011; Chu a Rana, 2008).

Základní proces zajišťuje štěpení dsRNA pomocí endonukleázy DICER (ribonukleáza typu III) na sRNA nebo krátké interferující RNA (short interfering RNA) dlouhé okolo 22-26 nukleotidů. Efektorem RNAi je ribonukleoprotein RISC (RNA induced silencing complex), kterým je cílena sRNA k homologní cílové mRNA sekvenci a přes endonukleázovou aktivitu RISC zprostředkuje její degradaci (Wilson a Doudna, 2013; Macrae a kol., 2006; Gregory a kol., 2005; Zhang a ko., 2004).

Krátké úseky RNA se mohou párovat i k DNA. Zdá se, že RNA je komponenta chromatinu a proteiny zapojené v chromatinových modifikacích mohou často vázat RNA nebo tvořit komplexy obsahující RNA. Patří do nich DNA metyltransferázy, heterochromatinový protein 1 (HP1), chromatin remodelující enzymy obsahující SET domény a chromodomény. Krátké RNA jsou schopny spustit epigenetické změny jako methylace DNA nebo modifikace histonů. Ve spojení s metyltransferázami a chromatin-modifikujícími enzymy dochází k *de novo* metylaci a transkripčnímu silencingu homologního promotoru v cílového lokusu (Di Ruscio a kol., 2013; Rougemaille a kol., 2012; Gonzalez a Li, 2012; Fire a kol., 1998; Morris a kol., 2004).

2.3 Senescence

Stárnutí je běžně označováno jako progresivní, všeobecné poškození funkcí organismu. Má za následek přílišnou přecitlivělost k vnějšímu prostředí, vzrůstající náchylnost k onemocnění a zvýšení šance úmrtí. Stárnutí je u člověka charakterizováno

ztrátou tělesných funkcí doprovázených degenerací buněk a tkání, snížením plodnosti a vzrůstem mortality. Tento proces je ireversibilní, napadá všechny orgány v těle i imunitní systém. Ke stárnutí přispívá mnoho celulárních funkcí. (Kirkwood, 2008; Holliday, 2004).

Stárnutí má tyto příznaky:

- i. Zkracování telomer. Se vzrůstajícím věkem se snižuje kapacita dělení buněk, což je pravděpodobně spojeno se zkracováním telomer (chrání konce chromozomů). Ke zkracování telomer dochází při každém dělení buňky díky absenci enzymu telomerázy, který se normálně vyskytuje pouze v zárodečné linii a v některých kmenových buňkách. Ztráta telomerické DNA je přisuzována neschopnosti DNA replikační mašinerie. Ta není v nepřítomnosti telomerázy schopná dokončit replikaci na opožďujícím se vlákně až do úplného konce. Na zkracování telomer má veliký vliv i stres, a to především oxidativní (Henriques a Ferreira, 2012; Gomes a kol, 2011).
- ii. Genomická nestabilita. Stárnutí jako následek akumulace neopravitelných buněčných a molekulárních poškození, které nastanou díky omezení v somatické údržbě a reparační schopnosti. Tyto poruchy se hromadí po celý život (od doby, kdy se začaly formovat somatické buňky a tkáně). Mnoho studií zaznamenalo, že věkem vzrůstá procento somatických mutací a dalších forem DNA poruch. Je možné, že určitá kapacita pro DNA poruchy je důležitý determinant rychlosti stárnutí na buněčné a molekulární úrovni. Je to vlastně vztah mezi dlouhověkostí a schopností oprav DNA (Moskalev a kol., 2013; Holliday, 2000; Morley, 1995).
- iii. Epigenetické změny. Během života dochází k epigenetickým změnám, které se týkají buněk a tkání. Patří sem změny v metylačních vzorech DNA, postranlační modifikace histonů a remodelace chromatinu. Zhoršuje se enzymatické zajištění a udržení epigenetických vzorů, což zahrnuje DNA metyltransferázy, histon acetylázy, deacetylázy, metylázy a demethylázy, stejně jako proteiny účastnící se remodelace chromatinu (Talens a kol., 2012; Han a Brunet, 2012; Pollina a Brunet, 2011).
- iv. Dysfunkce mitochondrií. Buňky, ve kterých mtDNA mutace dosáhnou vysoké hladiny, často trpí poruchou produkce ATP. To má za následek snížení tkáňové bioenergie. Další známkou stárnutí je hromadění ROS a s tím spojené narušení makromolekul

nukleových kyselin, lipidů a proteinů (Hekimi a kol., 2011; Green a kol., 2011; Trifunovic a Larsson, 2008; Nagley a Wei, 1998).

- v. Buněčná senescence. Zastavení růstu buňky jako odpověď na stres, která je spouštěna mnoha mechanismy, mezi které patří zkracování telomer, neopravitelné poruchy DNA a chromozomů a další. Hromadění senescentních buněk a ztráta dělení kmenových buněk přispívá ke stárnutí organismu (Muñoz-Espín a Serrano, 2014; Campisi a d'Adda di Fagagna, 2007).
- vi. Porucha homeostázy proteinů. Obrat proteinů je esenciální pro zachování buněčné funkce tím, že dochází k odstraňování poškozených nebo nadbytečných proteinů. Během stárnutí dochází k akumulaci poškozených proteinů a tato akumulace je spojována s velkou řadou onemocnění spojených se stárnutím. Hromadění proteinů je způsobeno snížením aktivity chaperonů a proteasomů (Koga a kol., 2011; Carrard a kol., 2002).
- vii. Vyčerpání kmenových buněk. Kmenové buňky disponují zvýšenou ochranou proti ROS a větším zastoupením proteinů teplotního šoku (HSP, heat shock protein) zajišťují prevenci proti nestabilitě proteinů. Jejich ochranné mechanismy jsou vyčerpatelné a ani kmenové buňky nežijí věčně (Vilchez a kol., 2014; Jung a Brack, 2014).
- viii. Mezibuněčná komunikace. Jedna z hlavních změn během stárnutí je takzvaný prozánětlivý fenotyp organismu. Tento stav je výsledkem hromadění prozánětlivých poškození tkání, dysfunkce imunitního systému vypořádat se s cizorodými parazity, produkcí prozánětlivých cytokinů senescentními buňkami atd. (López-Otín a kol., 2013).

Mnoho výzkumů se zaměřuje pouze na jeden mechanismus stárnutí. Stárnutí je však velice komplexní proces, při kterém se paralelně uplatňuje více mechanismů. Mechanismus buněčného a molekulárního stárnutí je výsledkem interakcí genetických, environmentálních a stochastických faktorů, což by mohlo vysvětlovat zřetelné rozrůznění fenotypů při stárnutí (Kirkwood, 2008).

2.3.1 Immunosenescence

Stárnutí imunitního systému nebo také imunosenescence je charakterizována snížením imunitní odpovědi na rozličné antigeny, poklesem schopnosti udržovat toleranci k antigenům vlastního těla, poklesem T a B buněčné funkce. Tyto změny a postupný úpadek imunitního systému objevující se v pozdějším věku jsou spojeny s rostoucí náchylností k infekcím, autoimunitním chorobám a nádorovému bujení (Sidler a kol., 2013; Cannizzo a kol., 2011; Grolleau-Julius a kol., 2010; Weiskopf a kol., 2009).

2.3.1.1 Stárnutí vrozené imunity:

Vrozená imunita je hlavní obrannou linií lidského těla. Buňky a celulární faktory (cytokiny, chemokiny a protimikrobiální peptidy) jsou jako strážci proti útoku mikrobů. Stárnutí je asociované se sníženou ochranou epiteliální bariéry (kůže, plíce a gastrointestinální trakt), zvýšením produkce prozánětlivých cytokinů (IL-6, TNF, TGF β) která přispívá k prozánětlivému fenotypu. Zdá se, že stárnutí nemá vliv na počet imunitních buněk (Pera a kol., 2015; Ponnappan a Ponnappan, 2011; Gomez a kol., 2005).

- i. Neutrofilní buňky jsou klíčové v obraně proti bakteriálním i mykotickým infekcím a při akutním zánětu. Jsou přitahováni z periferie chemokiny, které jsou vylučovány v místě infekce. Do místa infekce lákané neutrofiley adherují na endotel a prostupují do napadené tkáně. Jako jedny z prvních buněk dorazí na místo napadené patogenem a k tomu je důležitá náležitá chemotaxe. Během stárnutí se ukazuje, že schopnost chemotaxe klesá a s ní migrace jak do místa zánětu, tak migrace z místa zánětu. Neutrofilní buňky vykazují poškozené signální dráhy odpovídající za oxidativní vzplanutí, zhoršenou produkci ROS (reactive oxygen species) a nedokáží kvalitně eliminovat patogeny (Wessels a kol., 2010; Wenischa kol., 2000; Butcher a kol., 2001).
- ii. Makrofágy fungují jako patogenní senzory. Zahajují zánětlivou odpověď, odstraňují patogeny z těla, regulují adaptivní imunitní odpověď a spravují poškozené tkáně. Používají jak přímý způsob ničení patogenu nebo vylučují látky aktivující další imunitní buňky a předkládají antigeny na MHC glykoproteinech II. třídy T pomocným lymfocytům. Stárnoucí makrofágy vykazují sníženou expresi MHC II. třídy a nejsou tedy schopni efektivně aktivovat CD4⁺ T lymfocyty. U monocytů a makrofágů byla

pozorována změna ve fagocytóze, produkci reaktivních radikálů kyslíku, oxidu dusnatého a tedy snížení intracelulárního zabíjení, což má za následek dlouho přetrvávající infekce. Dále bylo nalezeno snížení exprese kostimulačních molekul a TLR (toll-like receptor).

- iii. Spojnice k adaptivní imunitě, dendritické buňky (DC) jsou profesionální antigen prezentujícími buňkami a jako takové jsou velmi důležité při spouštění imunitní odpovědi. DC mají ve stárnoucím organismu problémy s prezentací antigenu, chemotaxí a endocytózou. Dochází u nich ke snížení produkce IL-12 (interleukin 12) a exprese TLR (Wong a Goldstein, 2013).
- iv. NK buňky dokážou cytotoxicky bojovat proti virem napadeným buňkám a nádorům. Stárnutí postihuje NK buňky snížením cytotoxicity a produkcí cytokinů a chemokinů (Gayoso a kol, 2011; Le Garff-Tavernier a kol, 2010).

2.3.1.2 Stárnutí adaptivní imunity

Na získané imunitě se podílí především T lymfocyty, které mají antigenně specifické receptory, a B lymfocyty produkující imunoglobuliny. S věkem dochází ke ztrátě sebe obnovy hematopoetických kmenových buněk, mění se niky pro kmenové buňky a hematopoetické tkáně je v kostní dřeni stále méně (Henry a kol., 2011). Je zajímavé, že tyto změny nepostihují myeloidní a erytroidní linie buněk, ale týkají se hlavně B lymfocytů, kdy dochází ke generaci menšího počtu buněk a méně jich prochází diferenciačními kroky, což má ve finále následek menší počet maturovaných B lymfocytů opouštějících kostní dřeň (Waterstrat a Van Zant, 2009; Miller a Allman, 2005).

- i. Progenitory T lymfocytů opouštějí kostní dřeň a přesouvají se do thymu, kde dozrávají. S věkem dochází k ustupování brzlíku a nahrazování dřene a kůry tukovou tkání. Následkem je snížení počtu naivních T lymfocytů opouštějících brzlík (Dooley a Liston, 2012; Lynch a kol, 2009). Senescentní naivní lymfocyty ve srovnání s T lymfocyty od mladých lidí vykazují mnoho defektů: zkrácené telomery, omezený repertoár TCR (T Cell Receptor), sníženou expresi IL-2 (což je růstový faktor T buněk) a zhoršenou diferenciaci na efektorové buňky. Následkem je snížená schopnost vyvolat efektivní imunitní odpověď na nové antigeny. CD28⁺ T lymfocyty produkují často prozánětlivé cytokiny, což spolu se sníženou generací Treg lymfocytů během

stárnutí přispívá k věkem spojovanému rozvoji zánětu a autoimunitě (Macaulay a kol, 2013; Vadasz a kol, 2013; Weiskopf a kol, 2009).

- ii. Pro imunitní odpověď je důležité, aby naivní B lymfocyty rozeznávaly antigen na povrchu folikulárních dendritických buněk (FDC, follicular dendritic cell) v sekundárních lymfatických orgánech. Během stárnutí však dochází k snížení exprese kostimulačních molekul CD40 na povrchu B buněk, které jsou důležité pro aktivaci. Jedním z hlavních změn během stárnutí je jak u B tak u T buněk porucha komunikace a to hlavně exprese kostimulačních molekul CD28 na povrchu T lymfocytů, s tím spojená snížená exprese CD40L molekul, které jsou důležité pro aktivaci B lymfocytů. Dochází tedy ke snížení produkce protilátek. Snižuje se afinita receptoru B lymfocytů k antigenu a dochází k problémům v přesmyku imunoglobulinů (Blomberg a Frasca, 2013; Frasca a kol, 2011; Johnson a Cambier, 2004).

2.3.2 Epigenetické změny během stárnutí

Nové experimentální důkazy podporují důležitou roli epigenetických změn v buněčném stárnutí i stárnutí organismu. Stále však nebyl objasněn mechanismus, který je zodpovědný za ztrátu nebo nadbytek epigenetických značek při senescenci. Ukázalo se, že epigenetické značky se v průběhu života mění. Je tedy jisté, že změny v metylaci DNA a histonovém kódu jsou součástí stárnutí organismu (D'Aquila a kol., 2013; Berdasco a Esteller, 2012).

2.3.2.1 DNA metylace a stárnutí

DNA metylační vzory nejsou fixní. Během různých stádií vývoje savců jsou reprogramovány a starají se o normální embryogenezi a buněčnou diferenciaci. Tyto vzory se mohou během života lišit na základě různých stimulů z vnějšího i vnitřního prostředí. Jak vnější tak vnitřní stimuly jsou schopné indukovat ztrátu nebo zisk DNA metylace, která může být zajišťována během buněčného dělení a udržována napříč generacemi pro udržení daného fenotypu (Pujadas a Feinberg, 2012; Khavari a kol., 2010).

Vzrůstající ztráty celkového metylcytosinu se s věkem projevují v tkáních většiny obratlovců (včetně lidí). Hypometylaci přednostně napadá metylované skupiny, které nejsou součástí CpG ostrovů a repetitivních sekvencí. Další studie ukázaly, že k hypometylaci dochází i v oblastech promotorů, intronů, exonů i mezigenových regionů. Přesný

mechanismus genomické DNA demethylace není známý, ale jako původci jsou podezříváni především oxidativní stres a aktivace DNA poruch, které vedou ke ztrátě DNMT1 metyltransferázové aktivity (potažmo také poruchám v udržení metylačních vzorů během replikace). Hypermethylace byla nalezena v genech kódujících ribosomální DNA stejně jako v genech hrajících roli při DNA vazbě a regulaci transkripce. Deregulace takových genů může poškodit celou řadu intracelulárních drah (nádorovou supresi, rozvoj a růst, buněčnou adhezi, metabolismus, DNA opravy a kontrolu přenosu signálu). Shrnutí a potvrzení, ztráta epigenetické kontroly v průběhu stárnutí koreluje s nemocemi spojenými se stárnutím (rakovina, neurodegenerativní a kardiovaskulární onemocnění) a stárnutím jako takovým, tedy poklesem fyziologických a imunitních funkcí (D'Aquila a kol., 2013; Huidobro a kol., 2012; Bollati a kol., 2009).

Mechanismem vysvětlujícím změny v epigenetické regulaci může být dysregulace v expresi nebo funkci DNA metyltransferázy, případně enviromentální faktory. DNA poruchy nebo oxidativní stres mohou být odpovědné i za DNA demethylaci. Tyto faktory způsobují ztrátu DNMT1 metyltransferázové aktivity a potíže v udržení methylace během replikace. Dalším podezřelým je SAM (donor metylové skupiny pro mnoho metyltransferáz). Jeho metabolismus může být měněn během procesu stárnutí nebo jako výsledek enviromentálních faktorů, diet, dědičných faktorů a nadměrné konzumace alkoholu. Dalším viníkem způsobujícím poruchu katalytické aktivity DNMT1 může být nárůst kyslíkových radikálů. Toto jsou však jen domněnky. Než se objasní mechanismus způsobující hypomethylaci, ale i hypermethylaci DNA během života, je třeba zodpovědět ještě mnoho otázek (Carnero a Leonart, 2011; Liu a kol., 2011; Lopatina a kol., 2002).

2.3.2.2 Epigenetické úpravy histonů a stárnutí

Organizování chromatinu do vyšších struktur ovlivňuje funkci chromozomů a epigenetické regulace genů. Epigenetické remodelace jsou během života charakterizovány výskytem různých typů nebo kombinací modifikací histonů doprovázených redukcí na histonové úrovni. Tyto změny mají dramatický dopad na strukturu chromatinu. Dlouho trvající udržení struktury chromatinu je vyžadováno pro podporu biologických funkcí v procesu stárnutí.

In vivo a in vitro studie shrnuly globální nárůst trimetylace H4K20 a fosforylace H3S10, stejně jako snížení trimetylace H3K9 a H3K27 a acetylace H3K9 při procesech stárnutí (Tab. 2). Mnoho modifikací, které mění abundanci během *in vitro* stárnutí, je zahrnuto ve formaci heterochromatinu nebo procesech DNA poškození. Velká část modifikací histonů, jejichž množství se mění během senescence, komplikuje předvídání jak každá postranlační modifikace přispívá k změnám procesů v jádře. Dále jestli každá z těchto postranlačních modifikací nastane jako dopad stárnutí nebo hraje přímou roli při procesech stárnutí (Berdasco a Esteller, 2012; Feser a Tyler, 2011).

Tab. 2: Srovnání variant histonů a modifikací, které se mění s věkem. Soubor známých změn histonů a jejich variant, které se mění během života organismu (*in vivo*) nebo během stárnutí buňky (*in vitro*).

Modifikace	Změna s rostoucím věkem	Organismus
Globální acetylace histonů	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H3K9me	vzrůst	člověk (<i>in vitro</i>)
H3K9me2	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H3K9me3	pokles	člověk (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>)
H3K9ac	vzrůst	člověk (<i>in vitro</i>)
H3S10ph	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H3K27me3	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H3K56ac	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H4K16ac	vzrůst	člověk (<i>in vitro</i>)
H4K20me	vzrůst	člověk (<i>in vitro</i>)
H3K20me2	vzrůst	člověk (<i>in vitro</i>)
H3K20me3	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H3.1	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H3.3	vzrůst	člověk (<i>in vitro</i>)
H2A1	pokles	člověk (<i>in vitro</i>)
H2A2	vzrůst	člověk (<i>in vitro</i>)

(převzato a upraveno podle Feser a Tyler, 2011)

Velká část modifikací histonů je během stárnutí zapříčiněna změnami v množství chromatin modifikujících proteinů. Struktura chromatinu tyto změny (ustavení a udržení chromatinové struktury) prodělá díky snížené úrovni histonových chaperonů. Chaperony se

zapojují do kompletace (nebo rozložení) chromatinu během DNA replikace, DNA oprav a transkripce. Pokles hladiny histonových chaperonů může zapříčinit méně účinnou změnu chromatinové struktury a tedy znesnadnit jaderné procesy (O'Sullivan a kol., 2010).

2.3.3 MHC molekuly a stárnutí

Kandidátní geny, které se řadí mezi ovlivňující dlouhověkost, spadají do několika kategorií: prozánětlivé a s imunitním systémem spojené faktory, elementy stresové reakce, mediátory metabolismu glukózy a lipidů, komponenty zapojené do oprav DNA a haploskupiny mitochondriální DNA a buněčné proliferace. Díky centrální roli HLA molekul v rozvoji obranné imunity a nezvyklému stupni polymorfismu HLA genů bylo mnoho studií zaměřeno na možný dopad těchto genů na lidskou dlouhověkost. Některé studie předpokládají roli HLA II. třídy v lidské dlouhověkosti, ale definitivní důkaz zůstává skrytý. Kvůli značnému zapojení genů HLA v různých onemocněních a změnám exprese HLA genů během stárnutí organismu (Tab. 3) je pravděpodobné, že tyto molekuly ovlivňují stárnutí (Naumova a kol., 2011).

Tab. 3: HLA alely asociované se stárnutím. Několik ukázkových alel HLA genového komplexu, jejichž exprese se během dospívání a stárnutí mění.

HLA alely	Efekt
DRB1*11, DRB1*07 DRB1*13 DRB1*15, DRB1*01:01, *12:01, *1401 DQB1*05:03; DQA1*01:01,*05	zvýšení s pokročilým věkem
DR18	zvýšení u stoletých mužů ze Sicílie
DRB1*04:03, *13:02	snížení u stoletých

(převzato a upraveno podle Naumova a kol., 2011)

Úroveň exprese genů HLA II. třídy se zdá být ovlivňována stupněm metylace regulačních oblastí. Mění sílu promotoru a brání pravděpodobně vazbám transkripčních faktorů na daný regulační úsek genu. Hypermethylace oblastí promotorů HLA II. třídy může dokonce způsobit kompaktaci chromatinu a tak zabránit navázání transkripčních faktorů.

Snížená exprese MHC molekul II. třídy má dopad na imunitní odpověď a způsobuje nejrozumnější onemocnění (Majumder a Boss, 2011).

3 Cíle práce

Diplomová práce je součástí rozsáhlé studie, realizované na Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, která se zabývá epigenetickou regulací genů hlavního histokompatibilního systému II. třídy a její rolí v imunitním systému a stárnutí. Tato část studie je založena na předpokladu, že se stav metylace regulačních oblastí genů tohoto komplexu liší napříč generacemi. Stejně tak bude odlišná i úroveň exprese molekul hlavního leukocytárního antigenu mezi generacemi.

Pro tuto diplomovou práci byly stanoveny následující cíle:

- analýza metylace regulační oblasti genu DQB1, porovnání celkové metylace a metylace jednotlivých CpG mezi generacemi a mezi jednotlivými alelami v rámci věkových skupin
- analýza relativní úrovně exprese alel genu DQB1, porovnání úrovně mezi generacemi a mezi alelami v rámci generací
- korelace průměrné celkové metylace vzorků s jejich relativní úrovní exprese mRNA

4 Materiál

4.1 Pufry, roztoky a komerční soupravy

Na tomto místě je uveden původ chemikálií, enzymů a dalšího specifického materiálu (s výjimkou běžného spotřebního) použitého při experimentech popsanych v následující kapitole. Přístroje i zařízení byly použité podle pokynů výrobce a specifické nastavení je uvedené tehdy, když je nezbytné pro reprodukování experimentu. Pokud nebylo uvedeno jinak, byly komerční soupravy použité v souladu s doporučením výrobce.

Izolace DNA

RCLB (Red Cell Lysis Buffer)

5mM MgCl₂ (Serva)

320mM sacharóza (Sigma Aldrich)

1% Triton X-100 (Sigma Aldrich)

12mM Tris-HCl pH 7,5 (Sigma Aldrich)

WCLB (white cell lysis buffer)

120 mM EDTA pH 8,0 (Sigma Aldrich)

375 mM NaCl (Serva)

Proteinase K, 30U/mg (Qiagen)

10% SDS nebo 20% SDS (Sigma Aldrich)

6M NaCl (Serva)

99,8% etanol (Sigma Aldrich)

HLA genotypizační kity

Olerup SSP™ DR low resolution kit (Geno Vision)

Olerup SSP™ DQ low resolution kit (Geno Vision)

Olerup SSP™ *DQB1* * 02 (Geno Vision)

Olerup SSP™ *DQB1* * 03 (Geno Vision)

Olerup SSP™ *DQB1* * 04 (Geno Vision)
Olerup SSP™ *DQB1* * 05 (Geno Vision)
Olerup SSP™ *DQB1* * 06 (Geno Vision)
Olerup SSP™ *DQA1* (Geno Vision)
Taq DNA Polymeráza (5U/μl)(Fermentas)

Elektroforetická separace DNA

10x TBE pufr

890 mM Tris baze (Sigma Aldrich)
890 mM kyselina boritá (Amresco)
20 mM EDTA pH 8,0 (Sigma Aldrich)

Agaróza (Sigma Aldrich)
GelRed™ (Biotium)
Bromophenol Blue Loading Solution (Promega)
Marker 100bp DNA ladder (Biosystems)

Bisulfitová konverze

Epitect® Bisulfite Kit (Qiagen)

Amplifikace regulační oblasti *DQB1*

Primery byly syntetizované firmou IDT. Lyofilizované primery byly naředěné dH₂O na koncentraci 100 μl podle pokynů výrobce, před použitím byly naředěné na pracovní koncentraci 50 μl.

F1-DQB1: 5'TAAATTGGTGATTGTTATAGTTTAATTGGAATTTAGT 3'

F1-DQB1: 5'CTCAAAAATCTCCGCCATTAATAATAACCATT 3'

F2A-DQB1: 5'AGGGTAAATTTAGGTATGGGAAGGTAGGTAT 3'

F2A-DQB1: 5'CTCCAAACTTCCTTCTAACTATTCCAATACT 3'

F2B-DQB1: 5'AGTATTGGAATAGTTAGAAGGAAGTTTTGGAG 3'

F2B-DQB1: 5'AATATCTTATTTGCAACTATAATTACTAAATACCCTA 3'

dNTP's -100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Fermentas) naředěné na koncentraci 10mM
PCR H₂O (Sigma Aldrich)

PCR Reakční kit (Kapa Biosystems)

KAPA HiFi HotStart Uracil + Ready Mix (2×)

Izolace a přečistění PCR produktu

TAE pufru (50× koncentrovaný zásobní roztok)

40 mM Tris baze (Sigma Aldrich)

1 mM EDTA, pH 8 (Sigma Aldrich)

20 mM kyselina octová (Sigma Aldrich)

Low melting temperature agaróza (Sigma Aldrich)

Agaróza (Sigma Aldrich)

GelRed™ (Biotium)

6× Loading Dye Solution (Fermentas)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

99,5 % 2- propanol (Sigma Aldrich)

Přidávání PolyA konců

dATP (100mM)(Fermentas)

10x Taq pufr s NH₂(SO)₄ (Fermentas)

25 mM MgCl₂ (Fermentas)

Taq DNA polymeráza (5U/μl)(Fermentas)

Přečistění PCR produktu

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)

Klonování

DH5α *Escherichia coli* (genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)])(Stratagene)

XL1-Blue *Escherichia coli* (genotyp: F- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-*)(Merck)

pGEM-T Easy Vector (Genotyp: (Apr), *oriV ColE1 lacZ* 3000bp)(Promega)

Kultivační média

Kultivační roztoky a média byly před použitím sterilizovány v autoklávu při tlaku 0,1 MPa a teplotě 121° C po dobu 15 až 22 minut. Roztoky IPTG, X-Gal a antibiotika byla ošetřena filtrací přes 0,22 μ, Milipore filtr a před přidáním do média bylo médium zchlazeno na teplotu maximálně 55° C.

Příprava kultivačních misek

Bacto Agar (DIFCO)

LB bulion (Sigma Aldrich)

LB agar (Sigma Aldrich)

Ampicilin – sodná sůl (Sigma Aldrich)

X-Gal (Sigma Aldrich)

IPTG (Sigma Aldrich)

DMSO (Sigma Aldrich)

Příprava kompetentních bakterií

SOC médium

2,5mM KCl (Penta)

8,5mM NaCl (Penta)

20 g/L Tryptone (Sigma Aldrich)

5 g/L kvasničný extrakt (Sigma Aldrich)

2mM sterilní glukóza (Serva)

10mM MgCl₂ (Serva)

0.1 M CaCl₂ (Sigma Aldrich)

glycerol (Sigma Aldrich)

99,8% etanol (Sigma Aldrich)

Ligace a transformace kompetentních buněk

pGEM®-T Vector system (Promega)

T4 DNA Ligase

2x Rapid Ligation Buffer

pGEM®-T Vector (50ng/μl)

LB Broth base (Sigma Aldrich)

Izolace plazmidové DNA

QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)

QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen)

Izolace plazmidové DNA alkalickou lýzou

Roztok 1

50 mM glukóza (Serva)

10 mM EDTA (Sigma Aldrich)

25 mM Tris HCl (Sigma Aldrich)

Roztok 2

200 mM NaOH (Penta)

1% SDS (Sigma Aldrich)

Roztok 3

60 ml 5 M octan draselný (Penta)

11,5 ml bezvodá kyselina octová (Sigma Aldrich)

28,5 ml dH₂O

chloroform (Sigma Aldrich)

isopropanol (Sigma Aldrich)

etanol (Sigma Aldrich)

Štěpení plazmidové DNA

Apa I (Thermo Scientific)

10x pufr B (Thermo Scientific)

Izolace RNA

QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen)

70% etanol (Sigma Aldrich)

Reverzní transkripce

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Kvantitativní PCR

Lyofilizované primery a fluorescenčně značené (FAM/ ZEN/Iowa Black FQ) sondy byly dodané firmou Integrated DNA Technologies a byly naředěné na koncentraci 100 µl podle pokynů výrobce. Následně byly primery naředěné na pracovní koncentraci 10µM, na 5 µM pokud šlo o sondy.

*DQB1**02 F: 5' CGTGCGTCTTGTGAGCAGAA 3'

*DQB1**02 R: 5' CCCGTTTCCTCTCCAGGAT 3'

*DQB1**03:01 F: 5' GGGCGGTGACGCAGCT 3'

*DQB1**03:01 R: 5' CTGCACACCATGTCCAACCTC 3'

*DQB1**03:02 (*04) F: 5' GCCTTCGGGTAGCAACTGTG 3'

*DQB1**03:02 (*04) R: 5' GCGTACTCCTCTCGGTTATAGATGTA 3'

*DQB1**05 F: 5' CGTCTCAATTATGTCTTGGAAGAAGT 3'

*DQB1**05 R: 5' CTCTGCCCTCAGCCAGTGA 3'

*DQB1**06 F: 5' CTTCTCTCAGTTATGTCTTGGAAG 3'

*DQB1**06 R: 5' GAGTCTCTGCCCTCAGCCTGTA 3'

DQB1 total F: 5' CAGGTACATCAGATCCATCAGGTC 3'

DQB1 total R: 5' GTCCCGTTGGTGAAGTAGCAC 3'

DQB1 intron F: 5' CTAGGATGATGCCCACTTTGTG 3'

DQB1 intron R: 5' ACAGAACTTCAGCTTGATGCAGAT 3'

DRA1 F: 5' GGACAAAGCCAACCTGGAAA 3'

DRA1 R: 5' AGGACGTTGGGCTCTCTCAG 3'

sondy:

DQB1 *03:01, *02 5' TCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCGGC 3'

DQB1 *03:02, *04, total 5' ATCCTCGGGAGAGTCTCTGCCCTCA 3'

DQB1 *05, *06 5' CTCGGGTAGCAACTGTCACCTTGATGCT 3'

DQB1 intron 5' CCACTAGCAGCCTCTTTCAGTCACTGGAA 3'

DRA1 5' CAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTCCAGAG 3'

Taqman[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)

4 . 2 Použité přístroje

Autokláv Systec DE-23 (Systec)

Automatické pipety jednokanálové (0.1 – 2, 2 – 20, 20 – 200, 100 – 1000)(Nichiryo)

Shaker&Incubator NB-205 QF (N-BIOTEK)

Centrifuga chlazená Z 300 (Hermle)

Centrifuga MPW-51 (Mechanika Precyzyjna)

Elektroforetické vany (Sigma Aldrich)

Hlubokomrazící box U410 (New Brunswick)

Chladnička ARC (Whirlpool)

Kamera Gel logic 1500 (Kodak)

Laminární box Auramini (Bioair) a HERAsafe (Heraeus)

Mikrovlnná trouba (Zanussi)

Minicentrifuga Z 100 (Hermle)

Mraznička (Whirlpool)

Plynový kahan Schuett phoenix (Schuett-biotec)

PowerPac zdroj napětí pro elektroforézu (Bio-Rad)

Stolový vortex (Scientific industries)

Termocycler C1000TM (Bio-Rad) a LabCycler gradient (SensoQuest)

UV Transluminátor MUVB20 (UltraLum)

Váhy digitální 40SM-200A (Precisa)

4 . 3 Seznam počítačových programů

BioEdit

GraphPad Prism 6

Kodak Molecular Imaging software verzia 5.0 (Kodak)

7000 Sequence Detection Software 1.2.3 (Applied Biosystems)

5 Metody a postup práce

Tato studie je součástí rozsáhlejšího projektu zabývajícího se epigenetickými regulacemi nejen u zdravých kontrol různého věku, ale i pacienty s diabetem mellitem I. typu, kde zjišťujeme nejen metylace DNA regulačních oblastí genu *DQB1* ale i *DQA* a modifikace histonů.

Od 56 zdravých kontrol ve třech věkových skupinách (děti, lidé středního věku a senioři nad 60 let) bylo odebráno 10 ml plné nesražitelné periferní krve, ze které byla následně izolována DNA a RNA. DNA byla nejprve použita pro určení HLA genotypu (*HLA DRB1*, *HLA DQB1*, *HLA DQA1*). Dále byla DNA bisulfitována a cílový úsek amplifikován pomocí nested PCR. Cílový úsek byl zaklonovaný do bakterií a úspěšně transformované klony byly odeslány na sekvenaci. Metylační stav jednotlivých sekvencí byl statisticky zpracován. RNA byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA a použita pro stanovení exprese jednotlivých alel pomocí real-time PCR.

Všichni účastníci studie byli předem seznámeni s jejími cíly a před vlastním odběrem podepsali informovaný souhlas. Experimenty byly schváleny etickou komisí 3. LF UK.

5.1 DNA analýza

5.1.1 Izolace chromozomální DNA

Plná periferní krev byla odebrána do zkumavek s EDTA (antikoagulační látka). DNA byla izolována z 0,5 ml plné krve pomocí modifikované vysolovací metody (Miller a kol, 1988). Veškeré centrifugační kroky byly prováděny při pokojové teplotě a při 17, 000 x g.

1. Erytrocyty byly lyzovány 1 ml RCLB (red cell lysis buffer) a obsah promíchaný obracením zkumavky po dobu 30s. Suspenze byla centrifugována 5 minut.
2. Supernatant byl opatrně vylit a peleta promyta 1 ml dH₂O. Následovala pěti minutová centrifugace. Promytí bylo zopakováno podle potřeby (dokud nebyla suspenze čirá).
3. K peletě bylo přidáno 235 µl dH₂O a 80 µl WCLB (white cell lysis buffer) a peleta byla resuspendována. Následně bylo přidáno 40 µl 10% SDS (dodecylsulfát sodný)

- a 15 μ l proteinázy K (Sigma Aldrich).
4. Vzorky byly umístěné na otáčecí rotátor a inkubované 30 minut při 55° C v inkubátoru.
 5. Po inkubaci byly vzorky zchlazeny na laboratorní teplotu a bylo k nim přidáno 120 μ l 5M NaCl. Zkumavkami bylo velmi silně třepáno 15 s a následně byly stočené po dobu 6 minut.
 6. Supernatant byl odebrán do nové 1,5 ml zkumavky a stočen po dobu 3 min. Tento krok byl zopakován.
 7. K supernatantu byl přidán 1 ml absolutního etanolu (-20° C) a DNA byla vysrážena lehkým obracením zkumavky. Pro zvýšení výtěžku DNA byly vzorky inkubovány 20 min při -20°C.
 8. Po vysrážení byly vzorky 3 minuty stočené a supernatant opatrně vylit. Peleta byla promytá 1 ml 70% etanolu a následovala 3 minutová centrifugace a vylití supernatantu. Zbytkový etanol byl odstraněn vysušením DNA v laminárním boxu.
 9. DNA byla rozpuštěna ve 100-200 μ l dH₂O přes noc při 4° C a její koncentrace změřena na nanofotometru.

5.1.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Kvantita a kvalita DNA byla ověřena spektrofotometricky na nanofotometru (Implen, Německo) v křemenných kyvetách při vlnové délce λ 260. Znečištění RNA a proteiny bylo určeno srovnáním podílů absorbancí A260/280 a A260/240 v doporučeném rozmezí pro čistotu DNA přibližně 1,8.

5.1.3 HLA genotypizace

Genotypizace HLA II. třídy byla provedena pomocí alelově specifických HLA Olerup SSP™ kitů (Genevision, USA). Genotypizovaly se alely *HLA DQA1*, *HLA DQB1*, *HLA DRB1*. Po určení sérologické skupiny *HLA DQB1* za využití kitu HLA DQ low resolution, byly konkrétní podtypy jednotlivých alel *HLA DQB1* a *DQA1* určeny na základě high resolution *HLA DQB1*02, 03, 04, 05, 06* a *HLA DQA1*. Alely *HLA DRB1* byly určeny na úrovni sérologické skupiny a dále nebyla rozlišena.

1. Komponenty PCR reakce byly rozmrazeny na ledu a celá reakční směs byla

přenesena do mikrozkušavek po 10 µl. Celá reakční směs byla připravena podle Tab. 4. Počet PCR reakcí se různil podle genotypizačního kitu (min. 6- max. 32 PCR reakcí).

2. Po ukončení PCR reakce dle teplotního programu (Tab. 5) byly PCR produkty ověřeny na 2% TBE agarózovém gelu. Na gel byl nanesen celý reakční objem (10 µl). Po elektroforetické separaci byl gel vizualizovaný pomocí UV a gel vyfocen.
3. Naamplifikované HLA alely byly vyhodnoceny dle interpretační tabulky daného HLA Olerup SSP™ kitu.

Tab. 4: Složení reakční směsi pro HLA genotypizaci.

Složky reakce	Objem [µl]
Voda	4,92
PCR master mix	3,0
DNA (c= 30ng/µ)	2,0
Taq polymeráza	0,08
celkový objem*	10

*objem pro 1 reakci

Tab. 5: Teplotní program pro HLA genotypizaci.

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování
1. úvodní denaturace	94	120	
2. denaturace	94	10	
3. hybridizace a elongace	65	60	
4. opakování kroku 2→3			9x
5. denaturace	94	10	
6. hybridizace	61	50	
7. elongace	72	30	
8. opakování kroku 5→7			19x

5.1.4 TBE agarózová elektroforéza

Elektroforetická separace DNA byla prováděna na 2% TBE agarózovém gelu v elektroforetických vanách (Thermo Scientific) v horizontálním uspořádání.

1. 2% agarózový gel byl připravený z 2g agarózy smíchané se 100ml TBE pufru.
2. Celá směs byla rozpuštěna varem v mikrovlné troubě.
3. Po ochlazení na 60°C bylo ke kapalině přidáno 2,5 µl GelRed na 100 ml TBE. Gel byl nalit do elektroforetické vany a byly do něho umístěny hřebeny. Po zatuhnutí gelu a vytažení hřebenů byla elektroforetická vana naplněna TBE pufrem.
4. Do jamek v gelu byly naneseny vzorky. Kromě vzorků pro HLA genotypizaci byly ostatní před nanesením smíchané s 6x koncentrovaným nanášecím pufrem v poměru 5:1.
5. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 5 V/cm okolo 45 minut.

5.1.5 Bisulfitová konverze DNA

V průběhu bisulfitové konverze dochází pomocí hydrogensířičitanu sodného k přeměně nemetylovaného cytosinu na uracil a během PCR reakce jsou nahrazeny thyminem. Zatímco metylované cytosiny zůstávají nezměněny, což při sekvenování umožní určit počet metylovaných cytosinů.

Bisulfitová konverze DNA a následné přečištění bisulfitované DNA bylo provedeno pomocí Epitect[®] Bisulfite Kitu (Qiagen, USA). Všechny centrifugační kroky, pokud nebylo uvedeno jinak, byly provedeny při maximální rychlosti otáček po dobu 1 minuty na centrifuze.

1. Bisulfitový mix byl rozpuštěn v 800 µl vody bez RNAáz a reakční směs byla připravena podle Tab. 6.
2. 500 µl PCR zkumavky s reakční směsí byly vloženy do termocykleru za podmínek podle Tab. 7.

5.1.5.1 Přečištění bisulfitované DNA

1. Po proběhnutí bisulfitové reakce byla celá směs krátce stočena a přenesena do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek.
2. Ke vzorku bylo přidáno 560 µl BL pufru a celý roztok byl promíchán a krátce stočen.
3. Objem byl přenesený do Epitect spin kolonek, které byly umístěny do sběrných zkumavek. Následně byly centrifugovány po dobu 1 minuty a obsah sběrné zkumavky byl vylit.
4. Do kolonky bylo přidáno 500 µl BW pufru (před použitím smíchaného s etanolem podle pokynů výrobce) a kolonka centrifugována 1 minutu. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
5. Do kolonky bylo přidáno 500 µl BD pufru (smíchaný před použitím s etanolem podle pokynů výrobce) a kolonka byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě.
6. Kolonka byla stočená a obsah sběrné zkumavky vylit.
7. Do kolonky bylo přidáno 500 µl BW pufru a proběhla minutová centrifugace. Tento krok byl zopakován.
8. Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a byla zbavená reziduální

kapaliny minutovou centrifugací.

9. Kolonka byla opět umístěna do nové 1,5 ml zkumavky a inkubována v termobloku po dobu pěti minut při 56° C.
10. Na střed kolonky bylo nanášeno 20 µl dH₂O. DNA byla vymytá minutovou centrifugací a uložena na -20° C.

Tab. 6: Reakční komponenty bisulfitové konverze. Objemy jednotlivých složek reakce jsou uvedené pro jednu bisulfitovou reakci.

Složky reakce	Objem [µl]
DNA (1ng-2 µg)	Max 20*
Rase-free voda	*
Bisulfite mix	85
DNA Protect buffer	35
Celkový objem	140

* celkový objem DNA a vody je 20 µl. Do reakce bylo použito maximálně 2 µg DNA.

Tab. 7: Teplotní program pro bisulfitovou konverzi.

Reakční krok	Čas [min]	Teplota [°C]
1. denaturace	5	95
2. inkubace	25	60
3. denaturace	5	95
4. inkubace	85	60
5. denaturace	5	95
6. inkubace	175	60
Závěrečná inkubace	∞	20

5.1.6 Amplifikace produktu pomocí nested PCR

Z důvodu snížení komplexity DNA po bisulfitové konverzi byla použita nested PCR pro amplifikaci jednotlivých alel HLA. Vzhledem k vysokému obsahu CpG ostrovů a délky přes 1000 bp byl studovaný úsek *HLA DQB1* rozdělen na dvě části (úsek A a B). Vnější primery pro oba úseky jsou společné, přičemž nasedají v pozici 911 a 2428, vnitřní primery úseku A nasedají v pozicích 1057 a 1761 a amplifikují produkt o délce 704 bp, v úseku B na pozicích 1730 a 2343 a amplifikují produkt o délce 613 bp (Příloha 1.). PCR reakční směs byla připravena dle Tab. 8. a probíhala v termocykleru za podmínek uvedených v Tab. 9. Ke zvýšení pravděpodobnosti zachycení obou alel probíhaly reakce v dupletech. Výsledky amplifikace byly ověřeny na 2% TBE agarózovém gelu.

Tab. 8: Složení reakční směsi pro amplifikaci cílového úseku *DQB1*.

Složky reakce	Reakce 1	Reakce 2
	Objem [μl]	Objem [μl]
2× KAPA HiFi HotStart Uracil+ Ready Mix	7,5	7,5
Forward primer	0,25	0,25
Reverse primer	0,25	0,25
dH ₂ O	5,2	5,2
100% DMSO	0,3	0,3
DNA	1,5	1,5
Celkový objem	15	15

Tab. 9: Teplotní program pro amplifikaci cílového úseku *DQB1*.

Reakční krok	Reakce 1			Reakce 2A/2B		
	Teplota [°C]	Čas	Počet opakování	Teplota [°C]	Čas	Počet opakování
Počáteční denaturace	95	5 min		95	5 min	
Denaturace	98	20s	40	98	20s	40
Hybridizace	60	30s	40	61	30s	40
Elongace	72	1 min	40	72	1 min	40
Závěrečná inkubace	72	5 min		72	5 min	

5.1.7 Izolace a přečistění PCR produktu

Po proběhnutí reakce byly produkty rozděleny a izolovány z gelu a následně přečistěny soupravou QIAquick® Gel Extraction Kit. Jednotlivé kroky izolace z gelu jsou popsány níže:

1. Produkty byly nanášeny do připraveného 1% TAE agarózového gelu s GelRed® (2,5 µl na 100 ml gelu).
2. Dublety PCR produktů byly smíchané a nanesené na gel spolu s 6× koncentrovaným nanášecím pufrem v poměru 5:1.
3. Elektroforetická separace proběhla v elektroforetické vaně Powerpac 3000 po dobu 20 minut při konstantním napětí 5V /cm.
4. Po separaci byly produkty správné velikosti (kontrola pod UV transluminátorem) vyřezané a přenesené do předem připravených a zvážených 1,5 ml zkumavek. Mezi jednotlivými vzorky byl skalpel očištěn etanolem, aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých vzorků.
5. Zkumavky s gelem byly znovu zváženy a byla vypočítána hmotnost gelu.

5.1.7.1 Přečistění PCR produktu

Vzorky byly přečistěny pomocí QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, USA). Všechny kroky probíhaly při 17 900× g.

1. Gel byl rozpuštěn přidáním 3 objemových jednotek QG pufru (100mg gelu ~ 100 µl) a zkumavky byly inkubovány 10 minut při 50° C. V době inkubace byly zkumavky každé 3 minuty promíchány, aby se gel lépe rozpustil.
2. K vzorkům byla přidána jedna objemová jednotka isopropanolu a obsah zkumavek byl promíchán a přenesen do MinElute kolonek a zcentrifugován 1 minutu. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
3. Do kolonky bylo napipetováno 750 µl PE pufru a kolonky se nechaly 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Následně byla kolonka 1 minutu centrifugována.
4. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a zkumavka byla znovu centrifugována po dobu 1 minuty k odstranění případného zbytku PE pufru.

5. Kolonka byla vložena do čisté 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Do středu kolonky bylo nanášeno 30 μ l dH₂O a inkubována při pokojové teplotě 1 minutu. DNA byla eluována 1 minutovou centrifugací a uložena na -20° C.

5.1.8 Přidávání koncového adenylu a přečištění

Z důvodu 3'→5' exonukleázové aktivity KAPA HiFi DNA polymerázy je třeba k vyizolovanému a přečištěnému PCR produktu přidat 3' A konec.

Reakční směs na přidání koncového adenylu byla připravena podle Tab. 10. Reakční směs byla napipetována do PCR zkumavek, inkubována 15 minut v termocykleru při 72° C. PCR produkt s přidaným adenylem byl následně přečištěn pomocí QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, USA).

Všechny kroky přečištění produktu probíhali při 17 900× g.

1. K jedné objemové jednotce PCR produktu bylo přidáno pět objemových jednotek PB pufru.
2. Celý objem směsi byl napipetovaný do QIAquick kolonky, která byla umístěna do 2 ml sběrné zkumavky a centrifugovaná po dobu 60s. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
3. Zachycená DNA byla promyta 750 μ l PE pufru (před použitím přidaný 96-100% etanol podle pokynů výrobce) a proběhla minutová centrifugace.
4. Obsah sběrné zkumavky byl vylit a sběrná zkumavka vložena nazpět. Pro odstranění zbylé tekutiny byla kolonka znovu centrifugována po dobu 60s.
5. Poté byla kolonka vložena do 1,5 ml nové mikrocentrifugační zkumavky.
6. Na střed kolonky bylo napipetováno 30 μ l EB pufru. Po minutové inkubaci DNA byla vyeluována minutovou centrifugací. U takto připraveného PCR produktu byla změřena koncentrace a DNA byla použita na ligaci nebo zmražena na -20° C.

Tab. 10: Složení reakční směsi pro přidání koncového adenylu.

Složky reakce	Objem [μl]
PCR produkt	20
10×Taq pufr s KCl	3
Mg ²⁺ (25 mM MgCl ₂)	4,3
dATPs (10mM)	1,5
Tag DNA polymeráza	1,2
Celkový objem	30

5.1.9 Klonování

Přečištěný PCR produkt s přidáními A konci byl ligován do pGEM- T vektoru. Vzniklé plasmidy byly transformovány do chemokompetentních kmenů bakterie *E. Coli* DH5α nebo *E. Coli* XL1-Blue. Použitý kmen má delecii v genu pro α-peptid β-galaktosidázy. Tento gen se nachází v klonovacím místě vektoru a může být přerušen insertem. Selektce probíhá na médiu s IPTG (induktor β- galaktosidázy) a X-Galem (substrát pro β-galaktosidázu). V případě úspěšného vložení inzertu do vektoru dochází k přerušení čtecího rámce pro β- galaktosidázu (naštěpí se X-Gal) a kolonie jsou bílé. Pokud se insert do vektoru nevloží, dochází k expresi β- galaktosidázy a kolonie jsou modré. Selektční médium obsahuje ampicilin, ke kterému jsou transformované bakterie s vektorem rezistentní a tak netransformované bakterie na médiu nerostou.

Pro ověření přítomnosti vektoru s insertem v koloniích byl z bakterií *E. Coli* izolován plasmid. Vyizolovaný plasmid byl poté štěpen restriční endonukleázou. Takto naštěpený plasmid byl nanesen na TBE elektroforézu a velikost porovnána s kontrolním prázdným plasmidem vyizolovaným z netransformované (modré) kolonie. Bakterie vybrané na izolaci byly sterilním párátkem preočkované na nové misky s ampicilinem.

5.1.9.1 Příprava kompetentních buněk

Pro přípravu kompetentních buněk byly použité kmeny *E. Coli* DH5 α nebo *E. Coli* XL1-Blue podle upraveného protokolu Sambrooka a kol. (1989):

1. Do 3 ml LB/SOC média byly zaočkovány pomocí sterilního bakteriologického očka buňky *E. Coli* DH5 α nebo *E. Coli* XL1-Blue. Inokulum bylo poté kultivováno v inkubátoru NB205-QF (N- Biotek, Korea) 16-18 hodin při 250 rpm a 37° C.
2. Do sterilní Erlenmayerovi baňky se 100 ml LB/SOC média (ohřátého na 37° C) bylo přidáno po 1 ml inokula a baňka byla vložena do inkubátoru (37° C a 250 rpm).
3. Během inkubace byla po přibližně 80 minutách měřena optická densita při 600 nm, Další měření proběhlo po patnácti minutách, dokud nebyla OD 0,5- 0,6.
4. Růst bakterií byl zastaven 10 minutovou inkubací na ledu. Buňky v médiu byly přeneseny do vychlazených a sterilních 50 ml polypropylenových zkumavek a byly sesbírané 10 minutovou centrifugací při 2000 \times g.
5. Peleta byla resuspendována v 12,5 ml vychlazeným a sterilním 0,1M CaCl₂ a zkumavky zcentrifugované 10 minut při 2000 \times g.
6. Peleta resuspendována 12,5 ml vychlazeným a sterilním 0,1M CaCl₂ a zkumavky inkubovány 30 minut na ledě.
7. Buňky byly posbírané 10 minutovou centrifugací při 2000 \times g a peleta resuspendována v 3 ml vychlazeným a sterilním 0,1M CaCl₂ s 20% obsahem glycerolu.
8. Kompetentní buňky byly rozpipetovány po 100 μ l do 1,5 ml sterilním vychlazených zkumavek a ihned ponořené do etanolu vychlazeného na -70° C. Buňky byly skladované při -80° C v hlubokomrazícím boxu E310 (New Brunswick, UK).

5.1.9.2 Příprava kultivačních misek

1. Do lahve bylo naváženo 14g LB agaru a doplněno destilovanou vodou do objemu 400 ml. Dovnitř bylo umístěno magnetické míchadlo.
2. Roztok byl promíchán a autoklavován 15 minut při 121° C. Po vychlazení bylo přidáno 400 μ l ampicilinu (100 mg/ml), 400 μ l IPTG (100mM) a 400 μ l X-Gal (3%).
3. Celý roztok byl promíchán na magnetickém míchadle a nalit do petriho misek.

- Po ztuhnutí agaru byly misky přikryty víčkem a uloženy do chladničky.

5.1.9.3 Ligační reakce

Pro ligaci byl použit vektor pGEM®-T (Promega, USA). Molární poměr insertu k vektoru byl 3:1. Množství DNA vstupující do reakce bylo vypočítáno podle vzorce:

$$ng\ DNA = \frac{ng\ VEKTOR \times kbINZERT \times 3}{kb\ VEKTOR}$$

Ligační reakce byla připravená podle Tab. 11. Ligace proběhla při 4° C přes noc.

Tab. 11: Složení reakční směsi pro ligaci.

Složky reakce	Objem [μl]
2× Rapid Ligation Buffer	2,5
pGEM-T vector (50ng/μl)	0,5
PCR produkt	*
T4 DNA ligáza	0,5
dH ₂ O	*
Celkový objem	5

* Do reakce bylo použito množství PCR produktu které odpovídá 17 ng (DQB1 A úsek) a 15 ng (DQB1 B úsek) DNA na 1 μl. Reakční směs byla doplněna dH₂O do objemu 5 μl. Ligační směs byla připravena v polovičním objemu než doporučuje výrobce.

5.1.9.4 Transformování kompetentních buněk

- Suspenze kompetentních buněk *E. Coli* DH5α nebo *E. Coli* XL1-Blue byla rozmrazena na ledě a 50 μl těchto buněk bylo přidáno k celému objemu ligační reakce (5 μl). Tato nová reakční směs byla promíchána a inkubována 20 minut na ledě.
- Bakterie byly transformované tepelným šokem v termobloku při 42° C a následně umístěné na 2 minuty na led.
- Do 1,5 ml zkumavky s transformovanými bakteriemi bylo přidáno 950 μl sterilního

LB média a tyto byly umístěny do inkubátoru při 37° C na 150 rpm a 90 minut.

4. Na misky s LB agarem (ampicilin, X-Gal, IPTG) bylo nanášeno po 50 µl, 200 a 750 µl suspenze a rozetřeno pomocí sterilní hokejky.
5. Misky s rozetřenými bakteriemi byly inkubované přes noc při 37°C a vyhodnocené následující den.

5.1.10 Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována alkalyckou lýzou. V případech, kdy bylo nutno zajistit vyšší čistotu nebo množství plasmidové DNA, byly používány komerční soupravy.

5.1.10.1 Izolace plasmidové DNA alkalyckou lýzou

Roztok 1

50 mM glukosa

10 mM EDTA

25 mM Tris HCl

Roztok 2

200 mM NaOH

1% SDS

Roztok 3

60 ml KOAc (5M octan draselný)

11,5 ml bezvodé kyseliny octové

28,5 ml dH₂O

Pro izolaci plasmidové DNA z bakterií *E. Coli* byla použita také modifikovaná metoda standardní alkalické lýzy.

1. Pomocí sterilním bakteriálním očkem byly vybrány bílé kolonie zaočkované do 2 ml LB/ SOC média a kultivované při 37° C a 250 rpm přes noc.
2. Buňky byly přeneseny do 1,5 ml zkumavek a sesbírány minutovou centrifugací při 12 000 × g.
3. Peleta byla resuspendována v 100µl roztoku 1.
4. Následně bylo přidáno 200 µl roztoku 2 a ihned přidáno 200 µl chloroformu.

5. Buňky byly lyzovány 2 min a potom bylo přidáno 200 μ l roztoku 3.
6. Vzorky byly promíchány a centrifugovány při 12 000 \times g po dobu 10 minut.
7. Horní fáze byla odebrána do nových 1,5 ml zkumavek a DNA z nich vysrážena 500 μ l isopropanolu.
8. Zkumavky byly stočeny 10 minut při 12 000 \times g a supernatant odstraněn.
9. Peleta byla promyta 200 μ l 70% etanolu a stočena po dobu 5 minut při 12 000 \times g.
10. Supernatant byl opatrně vylit a DNA byla zbavena zbylého etanolu vysušením v laminárním boxu.
11. Plasmidová DNA byla rozpuštěna v 20 μ l vody a skladována při -20° C.

5.1.10.2 Izolace plasmidu- QIAGEN Plasmid Mini Kit

1. Sterilním bakteriálním očkem byly vybrány bílé kolonie zaočkované do 2 ml LB/ SOC média a kultivované při 37° C a 250 rpm přes noc.
2. Buňky byly přepipetovány do 2 ml mikrocentrifugačních zkumavek a sesbírané 15 ti minutovou centrifugací při 6000 \times g a 4° C. Peleta resuspendována v 300 μ l P1 pufru.
3. Následně bylo přidáno 300 μ l P2 pufru a směs míchána otáčením zkumavky 4-6 krát a inkubováno 5 minut při pokojové teplotě.
4. Do zkumavky bylo přidáno 300 μ l vychlazeného P3 pufru a znovu promícháno 4-6 krát inkubována 5 minut na ledě.
5. Zkumavka se směsí byla centrifugována po dobu 10 minut při 17 900 \times g.
6. Vyvázání QIAGEN-tip 20 kolonky proběhlo přidáním 1 ml QBT pufru, který se nechal protéct kolonkou.
7. Do kolonky byl přidán supernatant z kroku 7 a nechal se volně protéct.
8. Kolonka byla následně dvakrát promytá 2 ml QC pufru a pufr se nechal volně protéct kolonkou.
9. DNA byla eluována do mikrocentrifugační zkumavky přidáním 800 μ l QF pufru. K eluátu bylo přidáno 560 μ l izopropanolu laboratorní teploty. Směs byla promíchána a zcentrifugována 30 minut při 15 000 \times g.
10. Supernatant byl opatrně vylit a k peletě byl přidán 1 ml 70% etanolu. Proběhla 10 minutová centrifugace při 15 000 \times g.

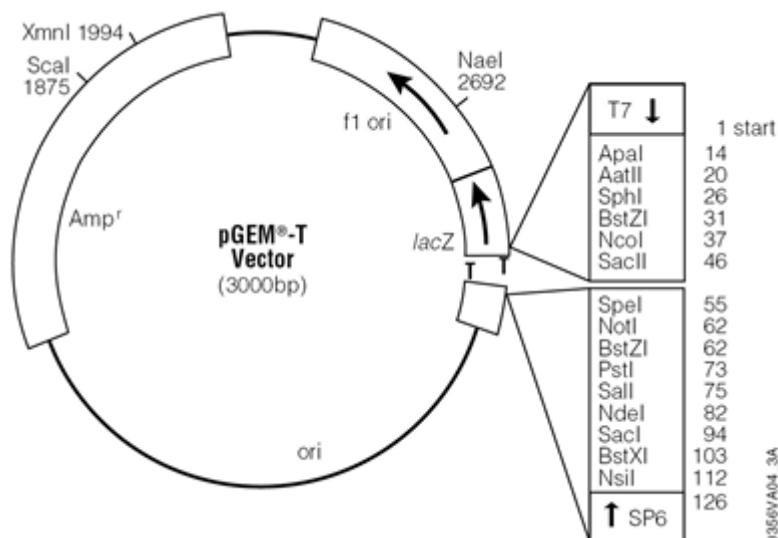
11. Supernatant byl opatrně vylit a DNA zbavena přebytečného etanolu vysušením v laminárním boxu.

12. Plazmidová DNA byla rozpuštěna v 20 µl vody a skladována při -20° C.

5.1.11 Štěpení plazmidové DNA restrikčními endonukleázami

Pro ověření správné velikosti vektoru s insertovaným úsekem bylo použito štěpení plazmidu restrikční endonukleázou PstI (Thermo Scientific). PstI štěpí plazmidový pGEM-T vektor 73 bp od klonovacího místa a linearizuje ho (Obr. 9).

Reakční směs byla připravena podle Tab. 12 a štěpení proběhlo v termocykleru při 37° C po dobu 90 minut. Ověřování velikosti úseků proběhlo pomocí TBE agarózové elektroforézy, kde lineární vektor (3000 bp) spolu s insertem DQB1 A úsek tvoří 3704 bp lineární DNA a B úsek 3613 bp. Tyto velikosti byly porovnány s velikostí prázdného vektoru (3000 bp).



Obr. 9: pGEM-T vektor (převzato z www.promega.com)

Tab. 12: Složení reakční směsi pro štěpení plazmidové DNA.

Složka reakce	Objem [μl]
plasmidová DNA	1
H pufr	1
Acetylované BSA	0.1
PstI	0.25
dH ₂ O	7.65
Celkový objem	10

5.1.12 Sekvenace

Na sekvenaci bylo vybráno a odesláno 6 až 8 klonů z jednoho úseku t.j. 12- 18 klonů od jednoho člověka. Odeslány byly pouze správné klony identifikované pomocí restriční analýzy. Vzorky byly sekvenované na Přírodovědecké fakultě UK. Zarovnání a vyhodnocení sekvencí probíhalo v programu Bioedit.

5 . 2 RNA analýza

5.2.1 Izolace RNA

Celková RNA byla izolována z plné krve pomocí kitu QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (Qiagen) podle postupu, který doporučuje výrobce. Všechny centrifugační kroky proběhly při 4° C.

1. 1,5 ml plné krve bylo smícháno se 7,5 ml EL pufru a směs inkubována 10-15 minut na ledu. Zkumavky byly během inkubace 2×zlehka zvortexovány.
2. Buňky byly stočeny při 500 × g 10 minut a supernatant byl poté opatrně odstraněn.
3. Peleta byla resuspendována 3 ml EL pufru a znovu stočena 10 minut při 500 × g. Supernatant byl opatrně odstraněn pipetou.
4. Peleta byla resuspendována v 600 μl RLT pufru (nejprve smíchaný s β-merkaptoetanolem podle pokynů výrobce).

5. Lyzát byl napipetován do QIAshredder kolonky umístěné do sběrné zkumavky a centrifugován 2 minuty při $17\,900 \times g$.
6. K filtrátu ve sběrné zkumavce bylo přidáno 600 μl 70% etanolu a filtrát promíchán pipetováním.
7. Celý objem sběrné zkumavky byl napipetován do QIAamp kolonky umístěné do sběrné zkumavky. Kolonka byla 15s centrifugována při $12\,000 \times g$.
8. QIAamp kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a promytá 700 μl pufru RW1 a znovu 15 s centrifugována při $12\,000 \times g$.
9. Kolonka byla opět přenesena do nové sběrné zkumavky a bylo k ní přidáno 500 μl RPE pufru (před použitím smíchaný s etanolem podle pokynů výrobce). Kolonka byla stočena 15s při $12\,000 \times g$.
10. Do kolonky bylo napipetováno 500 μl RPE pufru a byla stočena 3 minuty při $17\,900 \times g$.
11. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a stočena 1 minutu při $17\,900 \times g$.
12. Kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a na střed membrány kolonky bylo nanášeno 30 μl Rnase-free vody. RNA byla eluována minutovou centrifugací při $12\,000 \times g$.
13. Vyizolovaná RNA byla použita pro reverzní transkripci anebo skladována při -80°C .

5.2.2 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Postup podle doporučení výrobce.

1. Reakční směs pro reverzní transkripci byla připravena podle Tab. 13.
2. Po promíchání byla reakční směs rozpipetována po 10 μl do jednotlivých PCR zkumavek. Ke směsi bylo přidáno takové množství RNA aby výsledné množství v reakci bylo 300 ng (pokud to bylo možné).
3. Reakční směs byla doplněna RNase-free vodou do 20 μl a zkumavky byly promíchány a stočeny.
4. Takto připravené zkumavky byly umístěné do termocykleru a byl spuštěn

program pro reverzní transkripci podle Tab. 14.

Tab. 13: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci.

Složky reakce	Objem [μl]
10× RT pufr	2
25×dNTP mix (100nM)	0,8
10× RT náhodné primery	2
Multiscribe reverzní transkriptáza	1
Rnase-free voda	4,2
Celkový objem	10

Tab.14: Teplotní program pro reverzní transkripci.

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [min]
hybridizace	25	10
Reverzní transkripce	37	120
Inaktivace enzymu	5	85

1.1.2 Kvantitativní PCR

Pro určení míry exprese jednotlivých alel HLA DQB1 byla použita kvantitativní PCR s fluorescenčně značenou sondou TagMan™. Pro endogenní kontrolu byl použit gen *DRA* a *PPIA* a všechny uvedené kroky proběhly na ledu.

1. Před přípravou reakční směsi byla cDNA 10× ředěna na výsledný objem 30 ng/μl. Reakční směs byla připravena podle Tab. 15.
2. Do jamek 96- jamkové destičky bylo napipetováno 7,5 μl reakční směsi a 5 μl

naředěné cDNA. Reakce byly připravované v tripletech.

3. Destička byla krátce stočena při 2 000×g (minutu). Namnožení proběhlo v přístroji 7000 SDS ABI Prism podle programu uvedeného v Tab. 16.

Tab. 15: Složení reakční směsi pro kvantitativní PCR.

Složky reakce	Objem [μl]	Složky reakce pro PPIA	Objem [μl]
Gene expression master mix	6,25	Gene expression master mix	6,25
Forward primer	0,375	20*assay	0,625
Reverse primer	0,375	H ₂ O	0,625
Sonda (5μM)	0,5		
Celkový objem	7,5	Celkový objem	7,5

Tab. 16: Teplotní program pro kvantitativní PCR.

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet opakování
Aktivace UNG	50	2	
Aktivace polymerázy	95	10	
Denaturace	95	00:15	50
Hybridizace a elongace	60	1	50

5. 3 Statistická analýza

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism 6. Porovnání celkové metylace jednotlivých alel genu DQB1 bylo vyhodnocováno pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu na hladině významnosti 0,05. Analýza metylačních stavů jednotlivých CpG míst byla zpracována použitím Fisherova dvojstranného exaktního

testu na hladině významnosti 0,05. Asociace relativní exprese jednotlivých alel genu DQB1 a celkové metylace byla zpracována korelačním testem s Pearsonovým koeficientem.

6 Výsledky

6.1 Genotypizace HLA molekul

Alely HLA genů II. třídy (HLA-DQA1, HLA-DQB1 a HLA-DRB1) byly určeny pomocí sekvenčně specifických primerů a zpracované u 56 dárců krve. Zkoumaný soubor obsahuje 18 dětí, 18 lidí středního věku a 20 seniorů. Jednotlivé četnosti haplotypů pro věkové skupiny jsou zobrazeny v Tab. 17. Nejfrekventovanějším haplotypem je *DRB1*15-DQA1*01:02-DQB1*06:02*, který se u dárců středního věku vyskytuje se stejnou frekvencí jako haplotyp *DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03:01*.

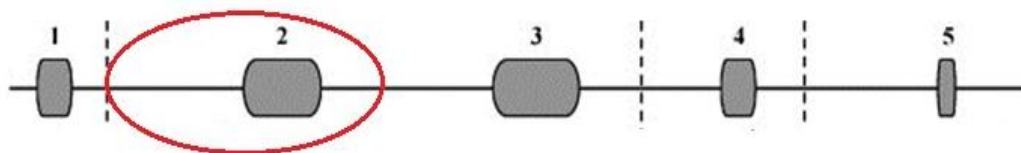
Tab. 17: Výsledky genotypizace HLA genů. Tabulka znázorňuje frekvence v % a četnosti (N) haplotypů pro věkové skupiny.

Genotyp			frekvence (N) 3-10 let	frekvence (N) 20-43 let	frekvence (N) 62-80 let
<i>DRA</i>	<i>DQA1</i>	<i>DQB1</i>			
15	01:02	06:02	23,5 % (8)	21,9 % (7)	15,4 % (6)
11	05:05	03:01	14,7 (5)	21,9 % (7)	5,1 % (2)
04	03:01	03:02	8,8 % (3)	6,3 % (2)	5,1 % (2)
12	05:05	03:01	8,8 % (3)	0 % (0)	0 % (0)
03	05:01	02:01	5,9 % (2)	3,1 % (1)	7,7 % (3)
16	01:02	05:02	5,9 % (2)	6,3 % (2)	7,7 % (3)
13	01:03	06:03	5,9 % (2)	3,1 % (1)	5,1 % (2)
01	01:01	05:01	2,9 % (1)	6,3 % (2)	12,8 % (5)
14	01:04	05:03	2,9 % (1)	0 % (0)	2,6 % (1)
11	01:02	05:02	2,9 % (1)	0 % (0)	0 % (0)
10	01:05	05:01	2,9 % (1)	0 % (0)	5,1 % (2)
07	02:01	02:02	2,9 % (1)	15,6 % (5)	5,1 % (2)
07	02:01	03:03	0 % (0)	0 % (0)	5,1 % (2)
08	04:01	04:02	0 % (0)	3,1 % (1)	2,5 % (2)
13	01:02	06:04	0 % (0)	3,1 % (1)	0 % (0)
04	03:03	03:01	0 % (0)	0 % (0)	10,3 % (4)
neklasické haplotypy			8,8 % (3)	9,4 % (3)	7,7 % (3)

6.2 Analýza metylačního stavu regulační oblasti *HLA DQB1*

Analýza metylačního stavu regulační oblasti genu *HLA DQB1* byla zpracována na základě sekvenace úseku dlouhého 1286 bp. Pro svou velikost byl úsek rozdělen na dva

úseky: úsek A dlouhý 704 bp a úsek B dlouhý 613 bp. Metylační status CpG dinukleotidů byl zjišťován od nukleotidu 1111 po nukleotid 1728 od startu transkripce pro úsek A. Úsek B byl analyzován od nukleotidu 1768 po 2304 od startu transkripce (Obr. 10). Oproti genu DQA1, který má regulační oblast v promotoru, má DQB1 regulační oblast v intergenovém úseku. Celkově bylo osekvenováno 310 vzorků. 116 vzorků bylo po sekvenaci ze souboru vyloučeno z důvodu rekombinace alel, bisulfidové konverzi menší než 95% nebo vložení nespecifického produktu. Zanalizováno bylo 194 vzorků z toho 137 vzorků úseku A (Příloha 4) a 57 vzorků úseku B (Příloha 5).



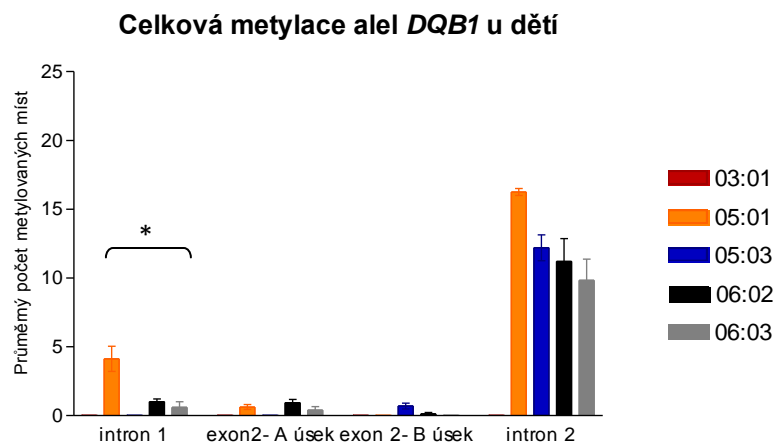
Obr. 10: Schématické znázornění exon-intron oblasti genu *DQB1*. Čísly jsou označeny jednotlivé exony mezi nimi introny a červenou elipsou je vyznačen námi sekvenovaný úsek.

6.2.1 Porovnání celkového metylačního stavu alel *HLA DQB1*

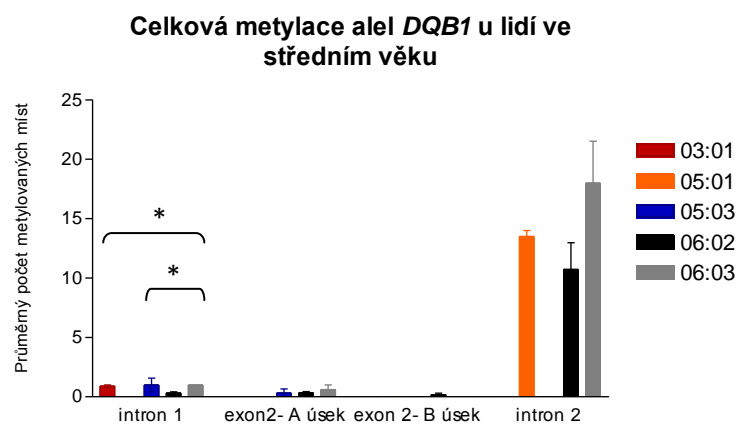
Rozdíly ve stavu celkové metylace mezi jednotlivými alelami byly určeny srovnáváním počtu všech metylovaných CpG míst v oblastech intronu 1 (od nukleotidu 1111 po 1563 vzhledem ke startu transkripce), exonu 2-A (od nukleotidu 1575 po 1728), exonu 2-B (od nukleotidu 1768 po 1818) a intronu 2 (od nukleotidu 1834 po 2304) u jednotlivých alel. Získaná data byla statisticky vyhodnocena neparametrickým Mann-Whitneyho testem s hladinou významnosti pět procent. Vypočítané hodnoty p byly korigovány na mnohočetná porovnání s využitím Bonferroniho korekce. Pokud se jednalo o porovnání alel mezi generacemi, p hodnoty byly násobeny počtem porovnávaných věkových skupin, v případě porovnávání stavu metylace alel mezi sebou v rámci jedné generace byly p hodnoty vynásobené počtem porovnávaných alel. Graf 1 zobrazuje porovnání celkové metylace zmiňovaných úseků alel mezi generacemi a také mezi jednotlivými alelami pro každou generaci. Hodnoty p pro jednotlivá porovnání jsou zobrazena pro intron 1 v Tab. 19, pro exon 2-A úsek v Tab. 20 a pro intron 2 v Tab. 21, kde hodnoty nižší než 0,05

jsou vyznačeny tučným písmem a hodnoty které zůstaly statisticky významné i po korelaci jsou podbarveny šedým pozadím. Statisticky významné rozdíly (po korelaci) v celkové metylaci jednotlivých alel DQB1 mezi generacemi jsme prokázali v úseku intronu 1. Alela 06:02 v intronu 1 je u vzorku dětí více metylovaná než u lidí ve středním věku ($p_{kor}= 0,0132$). Další statisticky významné rozdíly v rámci alel mezi generacemi se nám nepovedlo prokázat. Statisticky významné rozdíly prokázané mezi jednotlivými alelami DQB1 v různých úsecích v rámci jedné věkové skupiny jsou vypsány níže: v intronu 1 u dětí je alela 05:01 metylovaná ve větší míře než alela 06:03 ($p_{kor}= 0,015$), v intronu 1 u lidí ve středním věku jsme prokázali, že alela 06:02 je méně metylovaná než alela 06:03 ($p_{kor}=0,0144$) a 03:01 ($p_{kor}= 0,0004$), v intronu 1 seniorů je podobný trend tedy alela 06:02 je méně metylována než alela 05:01 ($p_{kor}= 0,0076$), v intronu 2 dětí je ve větší míře metylovaná alela 05:01 oproti 05:03 ($p_{kor}=0,008$).

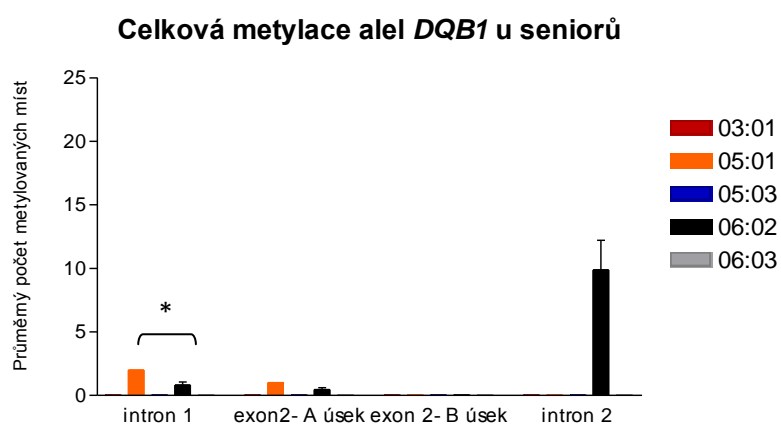
A)



B)



C)



Graf 1: Porovnání celkové metylace zmiňovaných úseků alel mezi generacemi a také mezi jednotlivými alelami pro každou generaci. A) Průměrný počet metylovaných míst jednotlivých alel u dětí. B) průměrný počet metylovaných míst jednotlivých alel u lidí ve středním věku. C) Průměrný počet metylovaných míst jednotlivých alel u seniorů.

Tab. 19: Porovnání celkové metylace intronu 1 pro jednotlivé alely mezi generacemi a porovnání celkové metylace intronu 1 alel pro každou generaci.

intron 1										
		děti			střední věk				senioři	
		06:02	06:03	05:01	06:02	06:03	05:03	03:01	06:02	05:01
děti	06:02	x	0,3142	0,0112	0,0044	x	x	x	0,4637	x
	06:03		x	0,005	x	0,1667	x	x	x	x
	05:01			x	x	x	x	x	x	0,2976
střední věk	06:02				x	0,0036	0,5826	0,0001	0,0808	x
	06:03					x	0,2857	0,9999	x	x
	05:03						x	0,1958	x	x
	03:01							x	x	x
senioři	06:02								x	0,0038
	05:01									x

Tab. 20: Porovnání celkové metylace exonu 2- A úseku pro jednotlivé alely mezi generacemi a porovnání celkové metylace intronu 1 alel pro každou generaci.

exon 2- A úsek										
		děti			střední věk				senioři	
		06:02	06:03	05:01	06:02	06:03	05:03	03:01	06:02	05:01
děti	06:02	x	0,3385	0,4702	0,0211	x	x	x	0,0968	x
	06:03		x	0,5921	x	0,9999	x	x	x	x
	05:01			x	x	x	x	x	x	0,2000
střední věk	06:02				x	0,6944	0,9999	0,047	0,7803	x
	06:03					x	0,8214	0,0952	x	x
	05:03						x	0,2308	x	x
	03:01							x	x	x
senioři	06:02								x	0,0094
	05:01									x

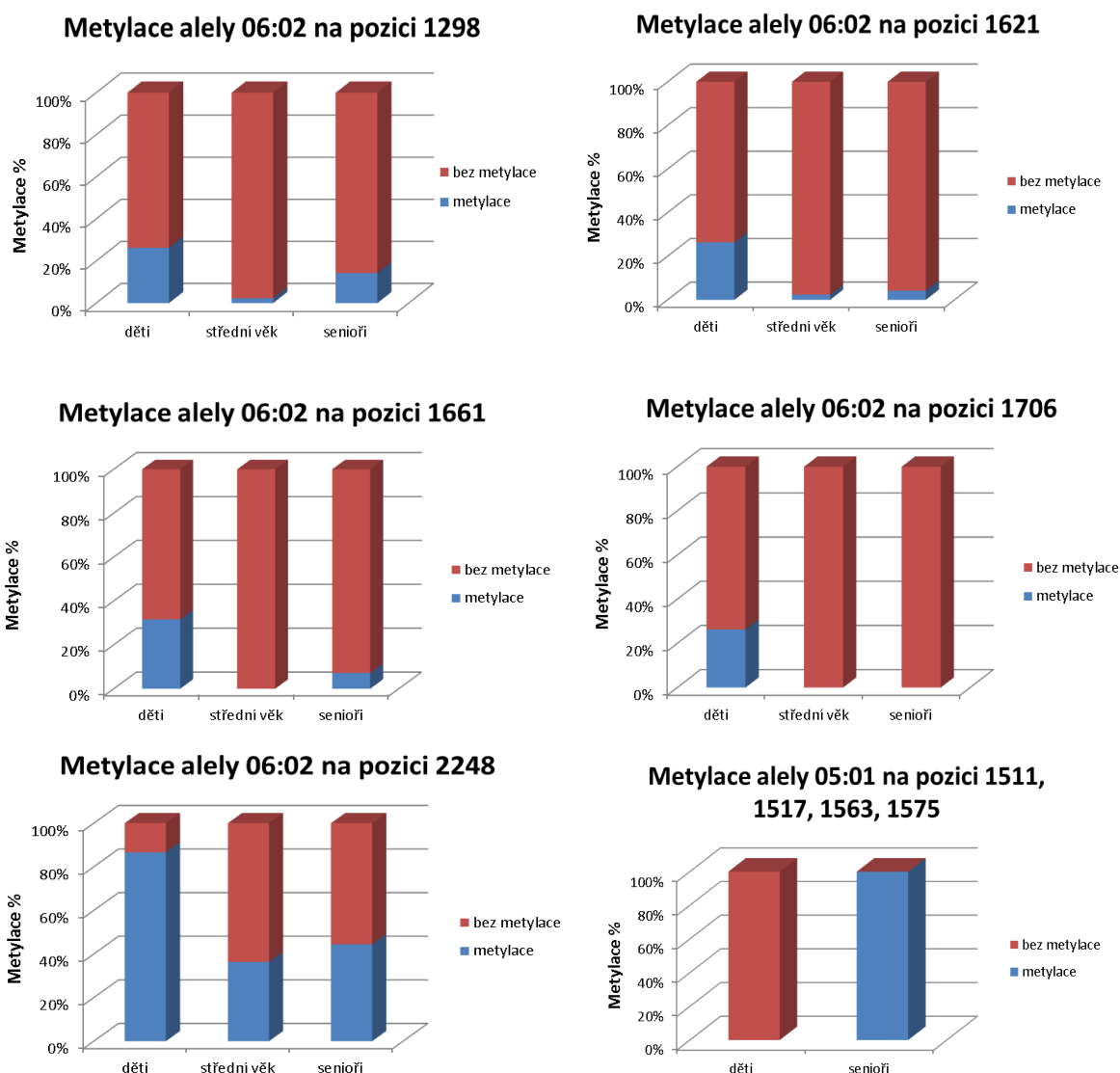
Tab. 21: Porovnání celkové metylace intronu 2 daných alel v rámci generace.

intron 2					
		děti			
		06:02	06:03	05:01	05:03
děti	06:02	x	0,9527	0,1233	0,7328
	06:03		x	0,057	0,2489
	05:01			x	0,002
	05:03				x

6.2.2 Porovnání metylačního stavu jednotlivých CpG míst *DQB1* alel

Rozdíly v metylačním stavu jednotlivých CpG míst byl určen Fisherovým exaktním testem s hladinou významnosti 0,05. Získaná data byla ošetřena Bonferoniho korekcí stejným způsobem jako v kapitole 6.2.1. Alely 06:03, 05:03, 0402 a 03:01 jsme

do vyhodnocování nezahrnuly, protože metylační status byl znám pouze u jedné ze tří věkových skupin. Pro další vyhodnocování pracujeme pouze s alelami 06:02 a 05:01. Po korekci byl statisticky významný rozdíl nalezen v pozicích 1298, 1621, 1651 1706 a 2248 (Graf 2) ve kterých je u dětí alela 06:02 metylovaná ve větší míře než u lidí ve středním věku ($p_{kor}= 0,0258$ pro pozici 1298, $p_{kor}= 0,0258$ pro 1621, $p_{kor}= 0,0012$ pro 1651, $p_{kor}= 0,0054$ pro 1706 a $p_{kor}= 0,0405$ pro 2248). V metylačním místě 1706 byl prokázán statisticky významný rozdíl pro alelu 06:02, která je u seniorů méně metylována než u dětí ($p_{kor}= 0,0363$). U alely 05:01 byl prokázán statisticky významný rozdíl v pozicích 1511, 1517, 1563 a 1575, ve kterých byli senioři metylováni ve větší míře než děti ($p_{kor}= 0,0004$ pro všechna metylační místa).



Graf 2: Porovnání četnosti metylace alel 06:02 a 05:01 mezi generacemi. Jednotlivé podgrafy znázorňují statisticky významná CpG místa nacházející se v pozicích 1298, 1621, 1661, 1706, 2248 pro alelu 06:02 a pro alelu 05:01 v pozicích 1511, 1517, 1563, 1575 od startu transkripce.

6.3 Analýza úrovně exprese mRNA genu *DQB1*

RNA vyizolována z leukocytů pacientů byla pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA a množství specifické mRNA bylo změřené real-time PCR. Všechny reakce, tedy reakce kvantifikující jednotlivé alely *DQB1*, gen pro *DRA*, *DQB1* total a intron a gen *PPIA* byly připravené v tripletech. Odlehlé hodnoty byly vyřazené a ze zbylých hodnot Ct byla

vypočítána průměrná hodnota C_t pro daný vzorek. Hladina exprese jednotlivých alel genu *DQB1* byla počítána vzhledem k expresi *DRA* (Tab. 22) a *PPIA*, které byly vybrány jako endogenní kontroly. Získané hodnoty byly upravené tak aby se odstranil vliv případné kontaminace DNA (některé z použitých assayí amplifikují i DNA). Obsah DNA byl určený pomocí assaye umístěné do intronu genu *DQB1* (*DQB1* intron). Relativní exprese jednotlivých alel byla vypočítána podle vzorce:

$$\frac{n_{DQB1}}{n_{DRA}} = \frac{(1 + U_{DRA})^{C_t}}{(1 + U_t)^{C_{tDQB1}}}$$

Písmeno n označuje množství genu či alely, které vstupuje do real-time PCR reakce a U označuje účinnost assaye. Účinnost assayí pro jednotlivé *DQB1* alely byla odvozená porovnáním hodnot C_t získaných z assaye pro danou alelu a z assaye, která amplifikuje všechny alely genu *DQB1* (*DQB1* total). U homozygotů je množství alely vstupující do reakce rovné celkovému množství genu *DQB1*, proto i hodnoty C_t pro obě assaye by měly být stejné. V případě, že se hodnoty C_t liší, vypočítá se z rozdílu mezi nimi rozdíl v účinnostech obou assayí. Součet hodnot relativní exprese obou alel *DQB1* u daného člověka byl porovnán s hodnotami relativní exprese pro *DQB1* total (kde výsledný poměr by měl být roven 1). Pokud se hodnoty nacházely mimo interval $<0,7;1,3>$, byly z dalšího statistického zpracování vyřazeny.

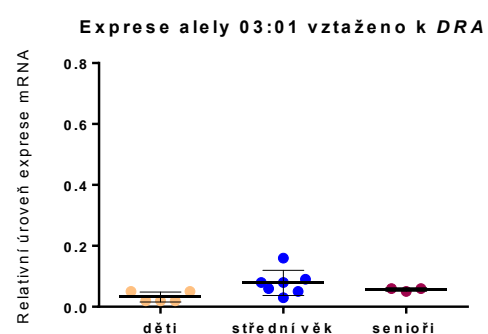
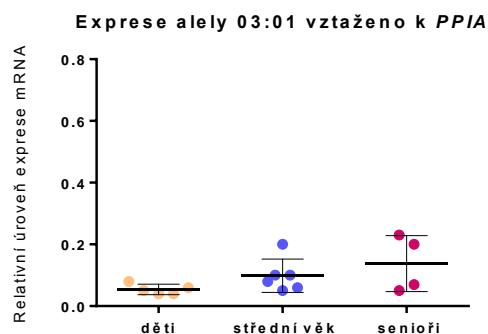
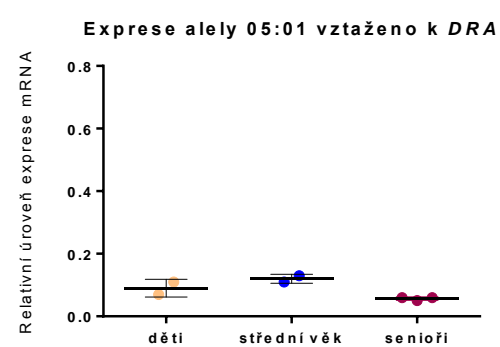
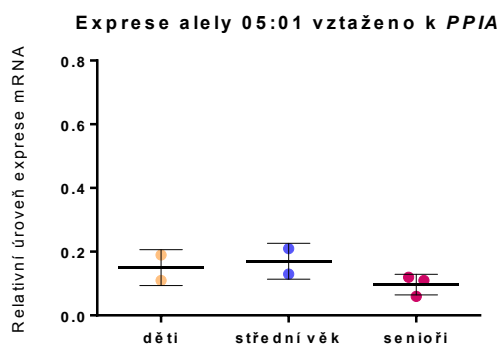
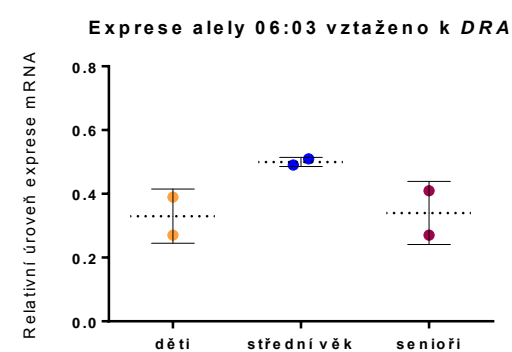
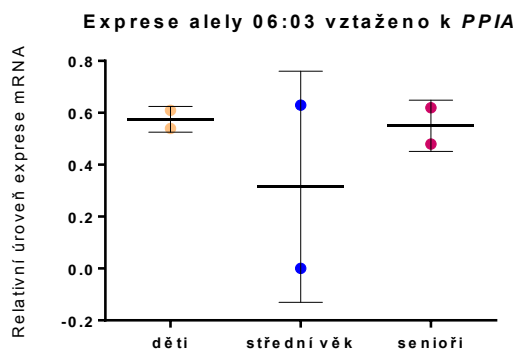
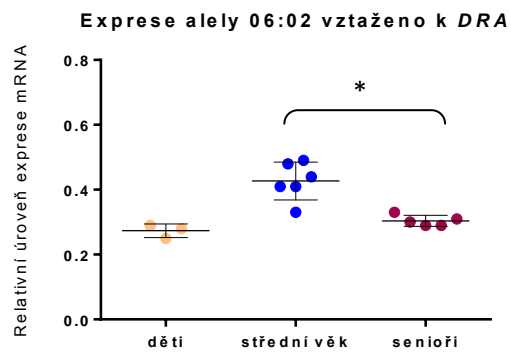
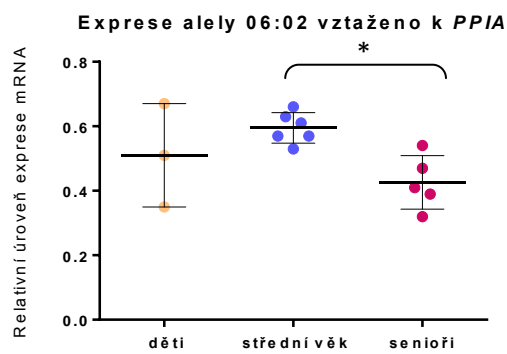
Tab. 22: Příklad úpravy dat získaných pro heterozygoty s alelami *DQB106 a *05.**

vzorek	DQB1*06 průměr C_t	DQB1*05 průměr C_t	DQB1 total průměr C_t	DRA průměr C_t	nDQB1*06 / nDRA	nDQB1*05 / nDRA	nDQB1*total / nDRA
D	25,56	26,17	28,37	22,75	0,28	0,07	0,16
S	23,86	23,89	26,65	21,75	0,44	0,19	0,24
P	26,95	27,64	29,23	24,28	0,30	0,06	0,27

6.3.1 Porovnání rozdílů relativní úrovně exprese mRNA jednotlivých alel

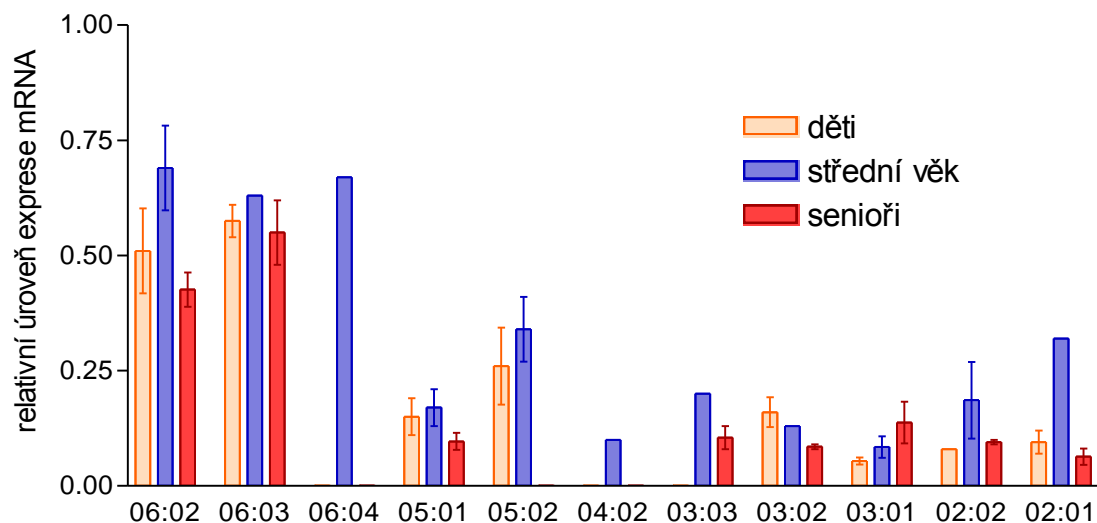
Expres jednotlivých alel genu *DQB1* byla vztažena k expresi molekuly *DRA* a *PPIA*. Srovnání rozdílů v expresích různých alel v rámci jednotlivých věkových skupin i rozdílů v expresi stejné alely mezi jedinci různých věkových skupin byly porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti 5 % a statisticky

významné rozdíly byly korigovány počtem porovnávaných alel *DQB1* v rámci generace, nebo počtem skupin pokud se porovnávaly jednotlivé alely mezi generacemi. Některé alely (06:04, 04:02, 03:02, 03:03, 02:02) jsme museli z vyhodnocení vyřadit pro nedostatečné množství vzorků. Výsledky jsou zobrazeny v Příloze 2 a 3. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny u lidí ve středním věku (Graf 4. a 5), kde je alela 06:02 exprimována ve větší míře než alely 03:01 ($p_{kor}=0,0072$) a 02:02 ($p_{kor}= 0,0258$). Z Grafu 3 je vidět, že alela 06:02 seniorů je méně exprimována než alela 06:02 u lidí ve středním věku ($p_{kor}=0,0195$ při vztažení k *DRA* a $p_{kor}= 0,0261$ při vztažení k *PPIA*).



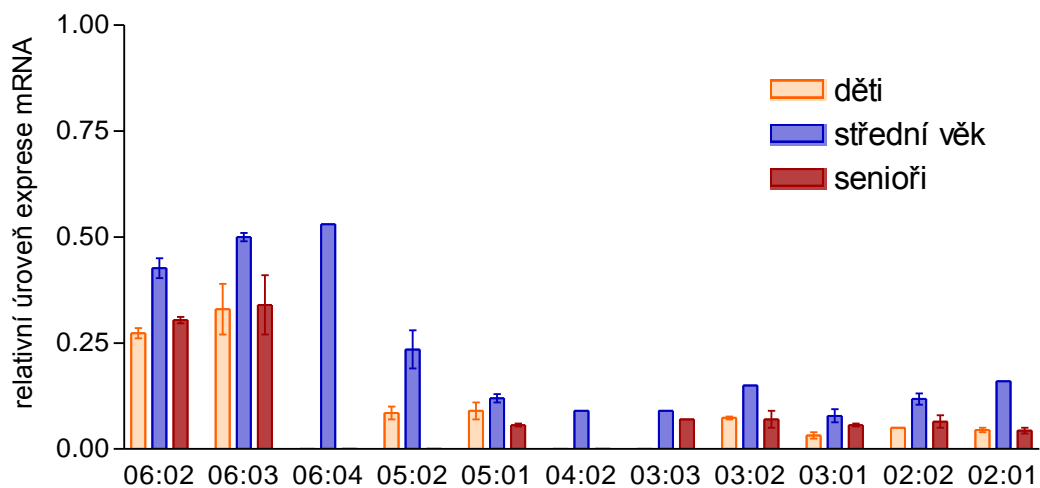
Graf 2.: Porovnání exprese jednotlivých alel *DQB1* mezi generacemi (vztaženo k genu *DRA* a *PPIA*).

Expresa alel *DQB1* vztaženo k *PPIA*



Graf 3: Relativní úroveň exprese mRNA *DQB1* alel mezi generacemi (vztaženo k expresi mRNA genu *PPIA*).

Expresa alel *DQB1* vztaženo k *DRA*



Graf 4: Relativní úroveň exprese mRNA *DQB1* alel mezi generacemi (vztaženo k expresi genu *DRA*).

6.3.2 Korelace relativní úrovně exprese mRNA genu *DQB1* a metylačního stavu promotoru

Na závěr jsme vyhodnotili relativní exprese jednotlivých alel ve vztahu k průměrné celkové metylaci v daných úsecích. Kvůli nedostatečnému počtu vzorků byla provedena korelace relativní exprese (vztažené k *DRA*) a průměrné celkové metylace v daných úsecích

(intron 1, exon 2 A úsek a B úsek, a intron 2) pouze u alely 06:02. Ostatní alely nebyly vyhodnoceny kvůli nedostatečnému množství vzorků. Data byla korelována pomocí Spearmanovy korelace s hladinou významnosti 0,05. Toto statistické vyhodnocení je vhodnější pro menší vyhodnocované soubory. Nepodařilo se prokázat statisticky významnou korelaci u alely 06:02.

7 Diskuze

HLA geny II. třídy jsou důležité pro včasný rozvoj antigenní odpovědi a jejich správná regulace je klíčová pro zdraví organismu. V regulačních oblastech těchto genů se nacházejí CpG místa jejichž metylační stav umožňuje regulaci transkripce. Metylovaná místa v regulační oblasti mohou znemožňovat vazbu transkripčních faktorů nebo označovat místa, na která se váží represivní komplexy. Stejně jako se imunitní odpověď mění v průběhu života, je možné, že úroveň metylace a exprese MHC molekul II. třídy se bude u různých věkových skupin lišit. Tato studie porovnává metylační stav regulačních oblastí alel *DQB1* a exprese alel tohoto genu mezi třemi věkovými skupinami.

Expresi HLA II. třídy může kolísat mezi vzorky. Tento rozdíl může být způsoben různým množstvím APC buněk (které exprimují HLA II. třídy) mezi leukocyty nebo různým množstvím signálů, které stimulují jejich expresi. Použití klasické endogenní kontroly PPIA (které všechny buňky exprimují stejné množství) může vést k rozdílným expresím mezi dvěma vzorky. Po vzoru studie Fernandez a kol. (2003) použitím endogenní kontroly z řad HLA II. třídy *DRA* (vykazuje nízký polymorfismus a je exprimována na buňkách exprimujících MHC II. třídy) je možné zbavit se rozdílů. V této studii byly použity obě endogenní kontroly. Rozdíly při vztahení k oběma kontrolám nejsou markantní a nedošlo k výraznému ovlivnění statistických hodnot. Rozdíly mohou být způsobeny např. začínající zánětlivou reakcí.

Výsledky genotypizace ukazují jaké haplotypy se nejčastěji objevují v námi vybraném vzorku populace. Nejfrekventovanějším haplotypem je u všech věkových skupin *DRB1*15-DQA1*01:02-DQB1*06:02*, i když u dárců středního věku je frekventovaná alela *DRB1*15-DQA1*01:02-DQB1*06:02* a *DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03:01*. Podle studie Klitz a kol. 2003 patří mezi nejběžnější haplotypy právě *DRB1*15-DQA1*01:02-DQB1*06:02* a *DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01*. Druhý haplotyp se v naší skupině nevyskytuje tak běžně, což může být způsobeno variabilitou mezi populacemi, protože studie se účastnili Američané evropského původu.

Analýza celkové metylace alel *DQB1* prokázala statistický významný rozdíl v intronu 1 alely 06:02, který je u dětí metylovaný ve větší míře než u lidí ve středním věku.

Mezigenerační rozdíly v metylaci žádné jiné alely se nám nepovedlo prokázat. To může být způsobeno nízkým počtem analyzovaných sekvencí alel, což pravděpodobně ovlivňuje výsledek Fisherova exaktního testu. Je zajímavé, že rozdíl byl nalezen právě v intronu 1. Většina metylovaných CpG míst se u alel DQB1 nachází v intronu 2, intron 1 a exon 2 jsou velmi málo metylované. V intronu 2 se metylační status příliš neliší mezi alelami ani mezi generacemi. Je možné, že po rozšíření souborů se ukáže statistický význam i zde. Míra exprese alely 06:02 je u lidí středního věku statisticky vyšší než u seniorů. Korelace relativní úrovně exprese alely 06:02 s metylačním profilem této alely se nepodařilo prokázat. Žádné další rozdíly nebyly nalezeny.

Během analýzy celkové metylace alel *DQB1* v rámci jedné věkové skupiny jsme našli menší míru metylace alely 06:03 oproti alele 05:01 v intronu 1 dětí. Pokud bychom se zaměřili na intron 2, je alela 05:03 u dětí méně metylována než alela 05:01.

Lidé ve středním věku mají v intronu 1 méně metylovanou alelu 06:02 oproti alelám 06:03 a 03:01. Zde se dají data podpořit také statisticky významnými rozdíly na úrovni exprese mRNA, kdy je alela 06:02 více exprimována než alely 03:01 a 02:02. Tento trend podporuje výsledky Brittenové a kol. (2009), kteří shledali alelu 06:02 exprimovanější než ostatní alely. Bohužel se nám nepodařilo tato data potvrdit korelační analýzou. Možnou úlohu metylace v tomto regulačním úseku na regulaci exprese alely 06:02 by však bylo třeba potvrdit rozsáhlejší studií s většími testovanými soubory. V našem měřítku není možné vyvozovat obecné závěry.

Podobný trend byl nalezen v intronu 1 seniorů, alela 05:01 je metylována ve větší míře než alela než 06:02. Data však nemůžeme potvrdit signifikantním rozdílem relativní exprese mRNA.

Dalším cílem studie bylo porovnání metylačního statusu jednotlivých CpG míst *HLA-DQB1* mezi věkovými skupinami. Většina statisticky významných pozic byla nalezena v intronu 1 a exonu 2. Signifikantní rozdíly byly nalezeny v pozici 1298, 1621, 1661, 2248 od startu transkripce pro alelu 06:02, kde je tato alela více metylována u dětí než u lidí ve středním věku. Na pozici 1706 je alela 06:02 u dětí více metylována oproti seniorům i oproti skupině středního věku. Pokud se blíže podíváme na alelu 05:01 v pozicích 1511, 1517, 1563 a 1575 je u seniorů metylace vyšší než u dětí. Zdá se, že u alely 0602 jsou

statisticky významná metylační místa u dětí více metylována než u vzorků středního věku a v případě pozice 1706 i více než u seniorů. Je možné, že v oblasti statisticky významných metylačních pozic dochází k vazbě transkripčních faktorů. Avšak žádné odpovídající faktory se nám nepodařilo najít.

Protože je studie provedena na menším počtu vzorků může se stát, že po rozšíření jednotlivých věkových souborů odhalíme další statisticky významné výsledky. Dalším krokem by proto mělo být získání většího počtu dárců hlavně v souborech dětí a seniorů.

8 Souhrn

Tato studie je součástí rozsáhlejšího projektu zabývajícího se výzkumem epigenetických regulací u genů HLA II. třídy. V rámci diplomové práce jsem stanovila metylační profil regulační oblasti genu *HLA DQB1* u tří věkových skupin. Dále jsem analyzovala relativní hladiny mRNA jednotlivých alel *HLA DQB1*. Výsledná data byla porovnána mezi sebou a byly vyvozeny tyto závěry:

- Nejčastější haplotyp našeho souboru odpovídá nejfrekventovanějšímu haplotypu potvrzenému studiemi.
- Snížená metylace alely 06:02 (alel skupiny 06) koreluje s publikovanými výsledky zabývajícími se relativní expresí alel *DQB1*.
- Mezigenerační rozdíly se jeví signifikantní v intronu 1 alely 06:02, která je u lidí ve středním věku méně metylovaná než u dětí.
- Porovnávány byly rozdíly v metylaci jednotlivých CpG dinukleotidů. Jako významné se jeví metylace nukleotidových pozic 1298, 1621, 1661, 2248, které jsou u alely 06:02 zvýšené u dětí oproti lidem ve středním věku. Alela 05:01 je v pozicích 1511, 1517, 1563 a 1575 metylovaná ve větší míře u seniorů než u dětí.
- Byla prokázána nejvyšší úroveň exprese alely 06:02 jak mezi alelami, tak mezi generacemi. U lidí ve středním věku je tato alela více exprimována než u seniorů.

Ve své PhD. práci bych ráda rozšířila soubory dárců a obohatila je o nositele všech hlavních alel, které jsou časté v české populaci. Cílem projektu bude porovnat expresi na úrovni mRNA s metylací DNA a modifikacemi histonů alel HLA genů *DQA1* a *DQB1*.

Zkoumáním epigenetických změn, které propojují genetický vliv a vliv prostředí, a jejich porovnáním s funkčním korelátem (genovou expresí) bychom mohli lépe porozumět etiopatologii chorob asociovaných s věkem.

9 Seznam literatury

- Bade-Döding C, Theodossis A, Gras S, Kjer-Nielsen L, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Huyton T, Rossjohn J, McCluskey J, Blasczyk R. The impact of human leukocyte antigen (HLA) micropolymorphism on ligand specificity within the HLA-B*41 allotypic family. *Haematologica*. 2011 Jan;96(1):110-8. doi: 10.3324/haematol.2010.030924. Epub 2010 Oct 7.
- Balakrishnan CN, Ekblom R, Völker M, Westerdahl H, Godinez R, Kotkiewicz H, Burt DW, Graves T, Griffin DK, Warren WC, Edwards SV. Gene duplication and fragmentation in the zebra finch major histocompatibility complex. *BMC Biol*. 2010 Apr 1;8:29. doi: 10.1186/1741-7007-8-29.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007 May 18;129(4):823-37.
- Bell JT, Saffery R. The value of twins in epigenetic epidemiology. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb;41(1):140-50. doi: 10.1093/ije/dyr179. Epub 2012 Jan 9.
- Bellacosa A. Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. *J Cell Physiol*. 2001 May;187(2):137-44.
- Berdasco M, Esteller M. Hot topics in epigenetic mechanisms of aging: 2011. *Aging Cell*. 2012 Apr;11(2):181-6. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00806.x.
- Berger AC, Roche PA. MHC class II transport at a glance. *J Cell Sci*. 2009 Jan 1;122(Pt 1):1-4. doi: 10.1242/jcs.035089.
- Blomberg BB, Frasca D. Age effects on mouse and human B cells. *Immunol Res*. 2013 Dec;57(1-3):354-60. doi: 10.1007/s12026-013-8440-9.
- Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009 Oct;118(5):549-65. doi: 10.1007/s00412-009-0221-9. Epub 2009 Jun 9.
- Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, Sparrow D, Vokonas P, Baccarelli A. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev*. 2009 Apr;130(4):234-9. doi: 10.1016/j.mad.2008.12.003. Epub 2008 Dec 27.
- Bollmer JL, Dunn PO, Whittingham LA, Wimpee C. Extensive MHC class II B gene duplication in a passerine, the common Yellowthroat (*Geothlypis trichas*). *J Hered*. 2010 Jul-Aug;101(4):448-60. doi: 10.1093/jhered/esq018. Epub 2010 Mar 3.
- Britten AC, Mijovic CH, Barnett AH, Kelly MA. Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear cells: alleles associated with susceptibility to and protection from

- autoimmune type 1 diabetes. *Int J Immunogenet*. 2009 Feb;36(1):47-57. doi: 10.1111/j.1744-313X.2008.00823.x.
- Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol*. 2001 Dec;70(6):881-6.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729-40.
- Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics*. 2011 Oct 19;74(11):2313-23. doi: 10.1016/j.jprot.2011.06.005. Epub 2011 Jun 21.
- Carnero A, Leonart ME. Epigenetic mechanisms in senescence, immortalisation and cancer. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2011 May;86(2):443-55. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00154.x. Epub 2010 Sep 16.
- Carosella ED, Jean Dausset 1916-2009. *Nat Immunol*. 2009 Aug;10(8):797. doi: 10.1038/ni0809-797.
- Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Nov;34(11):1461-74.
- Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetic and beyond. *Nat Rev Genet*. 2013 Feb;14(2):100-12. doi: 10.1038/nrg3355.
- Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009 May;10(5):295-304. doi: 10.1038/nrg2540.
- Cedar H1, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009 May;10(5):295-304. doi: 10.1038/nrg2540.
- Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI. CpG methylation of a silent controlling element in the murine Avy allele is incomplete and unresponsive to methyl donor supplementation. *PLoS One*. 2010 Feb 4;5(2):e9055. doi: 10.1371/journal.pone.0009055.
- Cuccato G, Polynikis A, Siciliano V, Graziano M, di Bernardo M, di Bernardo D. Modeling RNA interference in mammalian cells. *BMC Syst Biol*. 2011 Jan 27;5:19. doi: 10.1186/1752-0509-5-19.
- Černá M, Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr*. 2008;158(1-2):2-12. doi: 10.1007/s10354-007-0448-0.
- D'Aquila P, Rose G, Bellizzi D, Passarino G. Epigenetics and aging. *Maturitas*. 2013 Feb;74(2):130-6. doi: 10.1016/j.maturitas.2012.11.005. Epub 2012 Dec 12.

- Dausset J, The major histocompatibility complex in man. *Science*. 1981 Sep 25;213(4515):1469-74.
- Del Cid N, Jeffery E, Rizvi SM, Stamper E, Peters LR, Brown WC, Provoda C, Raghavan M. Modes of calreticulin recruitment to the major histocompatibility complex class I assembly pathway. *J Biol Chem*. 2010 Feb 12;285(7):4520-35. doi: 10.1074/jbc.M109.085407. Epub 2009 Dec 3.
- Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, Terragni J, Figueroa ME, De Figueiredo Pontes LL, Alberich-Jorda M, Zhang P, Wu M, D'Alò F, Melnick A, Leone G, Ebralidze KK, Pradhan S, Rinn JL, Tenen DG. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature*. 2013 Nov 21;503(7476):371-6. doi: 10.1038/nature12598. Epub 2013 Oct 9.
- Dooley J, Liston A. Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur J Immunol*. 2012 May;42(5):1073-9. doi: 10.1002/eji.201142305.
- Du Q, Luu PL, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*. 2015 Apr 30:1-23.
- Eizaguirre C, Yeates SE, Lenz TL, Kalbe M, Milinski M. MHC-based mate choice combines good genes and maintenance of MHC polymorphism. *Mol Ecol*. 2009 Aug;18(15):3316-29. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04243.x. Epub 2009 Jun 11.
- Elmer BM, McAllister AK, Major histocompatibility complex class I proteins in brain development and plasticity. *Trends in Neurosciences*. 2012 Nov; 35(11): 660-670, ISSN 0166-2236, 10.1016/j.tins.2012.08.001.
- Esteller M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol Rep*. 2011;3:9. doi: 10.3410/B3-9. Epub 2011 May 3.
- Fernandez S, Wassmuth R, Knerr I, Frank C, Haas JP. Relative quantification of HLA-DRA1 and -DQA1 expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Eur J Immunogenet*. 2003 Apr;30(2):141-8.
- Feser J, Tyler J. Chromatin structure as a mediator of aging. *FEBS Lett*. 2011 Jul 7;585(13):2041-8. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.016. Epub 2010 Nov 16.
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan;26(1):169-81.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A,

- Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 26;102(30):10604-9. Epub 2005 Jul 11.
- Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev*. 2011 Jul;10(3):330-5. doi: 10.1016/j.arr.2010.08.004. Epub 2010 Aug 20.
- Fritsch L, Robin P, Mathieu JR, Souidi M, Hinaux H, Rougeulle C, Harel-Bellan A, Ameyar-Zazoua M, Ait-Si-Ali S. A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol Cell*. 2010 Jan 15;37(1):46-56. doi: 10.1016/j.molcel.2009.12.017.
- Ganesan A, Nolan L, Crabb SJ, Packham G. Epigenetic therapy: histone acetylation, DNA methylation and anti-cancer drug discovery. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009 Dec;9(8):963-81.
- Gayoso I, Sanchez-Correa B, Campos C, Alonso C, Pera A, Casado JG, Morgado S, Tarazona R, Solana R. Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun*. 2011;3(4):337-43. doi: 10.1159/000328005. Epub 2011 May 11.
- Georgel PT, Horowitz-Scherer RA, Adkins N, Woodcock CL, Wade PA, Hansen JC. Chromatin compaction by human MeCP2. Assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):32181-8. Epub 2003 Jun 4.
- Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 2. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015 24/03;13(1):157-162. Epub 2015 Mar 24.
- Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 1. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015 24/03;13(1):153-156. Epub 2015 Mar 24.
- Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, Austad SN, Venditti C, Pagel M, Shay JW, Wright WE. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging Cell*. 2011 Oct;10(5):761-8. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00718.x. Epub 2011 Jun 1.
- Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ. The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 2005 Oct;17(5):457-62.
- Gonzalez M, Li F. DNA replication, RNAi and epigenetic inheritance. *Epigenetics*. 2012 Jan 1;7(1):14-9. doi: 10.4161/epi.7.1.18545. Epub 2012 Jan 1.
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*. 2011 Aug 26;333(6046):1109-12. doi: 10.1126/science.1201940.

- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):631-40. Epub 2005 Nov 3.
- Groettrup M, Schmidtke G. Selective proteasome inhibitors: modulators of antigen presentation? *Drug Discov Today*. 1999 Feb;4(2):63-71.
- Grolleau-Julius A, Ray D, Yung RL. The role of epigenetics in aging and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Aug;39(1):42-50. doi: 10.1007/s12016-009-8169-3.
- Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997 Sep 25;389(6649):349-52.
- Ha K, Lee GE, Palii SS, Brown KD, Takeda Y, Liu K, Bhalla KN, Robertson KD. Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery. *Hum Mol Genet*. 2011 Jan 1;20(1):126-40. doi: 10.1093/hmg/ddq451. Epub 2010 Oct 11.
- Han S, Brunet A. Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol*. 2012 Jan;22(1):42-9. doi: 10.1016/j.tcb.2011.11.001. Epub 2011 Dec 15.
- Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC, Knight JC. Regulation of major histocompatibility complex class II gene expression, genetic variation and disease. *Genes Immun*. 2010 Mar;11(2):99-112. doi: 10.1038/gene.2009.83. Epub 2009 Nov 5.
- Haque FN, Gottesman II, Wong AH. Not really identical: epigenetic differences in monozygotic twins and implications for twin studies in psychiatry. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2009 May 15;151C(2):136-41. doi: 10.1002/ajmg.c.30206.
- Havlicek J, Roberts SC. MHC-correlated mate choice in humans: a review. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 May;34(4):497-512. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.10.007. Epub 2008 Dec 2.
- Hedrick PW, Thomson G. Maternal-fetal interactions and the maintenance of HLA polymorphism. *Genetics*. 1988 May;119(1):205-12.
- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol*. 2011 Oct;21(10):569-76. doi: 10.1016/j.tcb.2011.06.008. Epub 2011 Aug 6.
- Hendrich B, Abbott C, McQueen H, Chambers D, Cross S, Bird A. Genomic structure and chromosomal mapping of the murine and human Mbd1, Mbd2, Mbd3, and Mbd4 genes. *Mamm Genome*. 1999 Sep;10(9):906-12.
- Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998 Nov;18(11):6538-47.
- Henriques CM, Ferreira MG. Consequences of telomere shortening during lifespan. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Dec;24(6):804-8. doi: 10.1016/j.ceb.2012.09.007. Epub 2012 Nov 2.

Henry CJ, Marusyk A, DeGregori J. Aging-associated changes in hematopoiesis and leukemogenesis: what's the connection? *Aging* (Albany NY). 2011 Jun;3(6):643-56.

Holliday R. Somatic mutations and ageing. *Mutat Res*. 2000 Oct;463(3):173-8.

Holliday R. The multiple and irreversible causes of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004 Jun;59(6):B568-72.

Hořejší V, Bartůňková J, *Základy imunologie*. 4. vydání. 2009. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-280-9.

Huidobro C, Fernandez AF, Fraga MF. Aging epigenetics: Causes and consequences. *Mol Aspects Med*. 2012 Jul 4.

Hum Immunol. 2011 Apr;72(4):319-29. doi: 10.1016/j.humimm.2011.01.009. Epub 2011 Jan 21.

Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update*. 2006 May-Jun;12(3):209-32. Epub 2005 Nov 9.

Chen CC, Wang KY, Shen CK. DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *J Biol Chem*. 2013 Mar 29;288(13):9084-91. doi: 10.1074/jbc.M112.445585. Epub 2013 Feb 7.

Choi NM, Majumder P, Boss JM. Regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Curr Opin Immunol*. 2011 Feb;23(1):81-7. doi: 10.1016/j.coi.2010.09.007. Epub 2010 Oct 21.

Chu CY, Rana TM. Potent RNAi by short RNA triggers. *RNA*. 2008 Sep;14(9):1714-9. doi: 10.1261/rna.1161908. Epub 2008 Jul 24.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The major histocompatibility complex and its functions. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27156/>

Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer*. 2011 Jun;2(6):607-17. Doi: 10.1177/1947601910393957.

Johnson AD, O'Donnell CJ, An open access database of genome-wide association results. *BMC Med Genet*. 2009 Jan 22;10:6. doi: 10.1186/1471-2350-10-6.

Johnson SA, Cambier JC. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(4):131-9. Epub 2004 May 10.

Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*. 2009 Nov;10(11):805-11. doi: 10.1038/nrg2651. Epub 2009 Sep 30.

Jung Y, Brack AS. Cellular mechanisms of somatic stem cell aging. *Curr Top Dev Biol*. 2014;107:405-38. doi: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00014-7.

- Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*. 2011 Jan 24;12(2):206-22. doi: 10.1002/cbic.201000195. Epub 2010 Nov 29.
- Khavari DA, Sen GL, Rinn JL. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. *Cell Cycle*. 2010 Oct 1;9(19):3880-3. Epub 2010 Oct 20.
- Kim MS, Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res*. 2005;64(4):180-8. Epub 2005 Oct 24.
- Kirkwood TB. Understanding ageing from an evolutionary perspective. *J Intern Med*. 2008 Feb;263(2):117-27. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01901.x.
- Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, Fernandez-Viña M. New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens*. 2003 Oct;62(4):296-307.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev*. 2011 Apr;10(2):205-15. doi: 10.1016/j.arr.2010.02.001. Epub 2010 Feb 10.
- Krawczyk M, Peyraud N, Rybtsova N, Masternak K, Bucher P, Barras E, Reith W. Long distance control of MHC class II expression by multiple distal enhancers regulated by regulatory factor X complex and CIITA. *J Immunol*. 2004 Nov 15;173(10):6200-10.
- Krawczyk M, Seguí-Estévez Q, Leimgruber E, Sperisen P, Schmid C, Bucher P, Reith W. Identification of CIITA regulated genetic module dedicated for antigen presentation. *PLoS Genet*. 2008 Apr 25;4(4):e1000058. doi: 10.1371/journal.pgen.1000058.
- Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*. 2003 Jun 1;116(Pt 11):2117-24.
- Lan J, Hua S, He X, Zhang Y. DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010 Apr;42(4):243-52.
- Le Garff-Tavernier M, Béziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, Pautas E, Debré P, Merle-Beral H, Vieillard V. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell*. 2010 Aug;9(4):527-35. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00584.x. Epub 2010 May 10.
- Liu L, van Groen T, Kadish I, Li Y, Wang D, James SR, Karpf AR, Tollefsbol TO. Insufficient DNA methylation affects healthy aging and promotes age-related health problems. *Clin Epigenetics*. 2011 Aug;2(2):349-60. doi: 10.1007/s13148-011-0042-6. Epub 2011 Jun 12.

- Lopatina N, Haskell JF, Andrews LG, Poole JC, Saldanha S, Tollefsbol T. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2002;84(2):324-34.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol.* 2009 Jul;30(7):366-73. doi: 10.1016/j.it.2009.04.003. Epub 2009 Jun 18.
- Macaulay R, Akbar AN, Henson SM. The role of the T cell in age-related inflammation. *Age (Dordr).* 2013 Jun;35(3):563-72. doi: 10.1007/s11357-012-9381-2. Epub 2012 Jan 15.
- MacDonald VE, Howe LJ. Histone acetylation: where to go and how to get there. *Epigenetics.* 2009 Apr 1;4(3):139-43. Epub 2009 Apr 18.
- Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, He J, Hurley CK, Middleton D, Moraes ME, Pereira SE, Kempenich JH, Reed EF, Setterholm M, Smith AG, Tilanus MG, Torres M, Varney MD, Voorter CE, Fischer GF, Fleischhauer K, Goodridge D, Klitz W, Little AM, Maiers M, Marsh SG, Müller CR, Noreen H, Rozemuller EH, Sanchez-Mazas A, Senitzer D, Trachtenberg E, Fernandez-Vina M. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens.* 2013 Apr;81(4):194-203. doi: 10.1111/tan.12093.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science.* 2006 Jan 13;311(5758):195-8.
- Majumder P, Boss JM. DNA methylation dysregulates and silences the HLA-DQ locus by altering chromatin architecture. *Genes Immun.* 2011 Jun;12(4):291-9. doi: 10.1038/gene.2010.77. Epub 2011 Feb 17
- Marsh SG; WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2010. *Tissue Antigens.* 2011 Apr;77(4):362-3. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01642.x.
- Meaney MJ. Epigenetics and the biological definition of gene x environment interactions. *Child Dev.* 2010 Jan-Feb;81(1):41-79. doi: 10.1111/j.1467-8624.2009.01381.x.
- Menafrá R, Stunnenberg HG. MBD2 and MBD3: elusive functions and mechanisms. *Front Genet.* 2014 Dec 9;5:428. doi: 10.3389/fgene.2014.00428. ECollection 2014.
- Miller JP, Allman D. Linking age-related defects in B lymphopoiesis to the aging of hematopoietic stem cells. *Semin Immunol.* 2005 Oct;17(5):321-9.

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
- Molina-Serrano D, Kirmizis A. Beyond the histone tail: acetylation at the nucleosome dyad commands transcription. *Nucleus.* 2013 Sep-Oct;4(5):343-8. doi: 10.4161/nucl.26051. Epub 2013 Aug 9.
- Morley AA. The somatic mutation theory of ageing. *Mutat Res.* 1995 Oct;338(1-6):19-23.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science.* 2004 Aug 27;305(5688):1289-92. Epub 2004 Aug 5.
- Mosammaparast N, Shi Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:155-79. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103946.
- Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 2013 Mar;12(2):661-84. doi: 10.1016/j.arr.2012.02.001. Epub 2012 Feb 14.
- Müller-Hilke B, Mitchison NA. The role of HLA promoters in autoimmunity. *Curr Pharm Des.* 2006;12(29):3743-52.
- Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, Edwards CA, Ashurst JL, Wilming L, Jones MC, Horton R, Hunt SE, Scott CE, Gilbert JG, Clamp ME, Bethel G, Milne S, Ainscough R, Almeida JP, Ambrose KD, Andrews TD, Ashwell RI, Babbage AK, Bagguley CL, Bailey J, Banerjee R, Barker DJ, Barlow KF, Bates K, Beare DM, Beasley H, Beasley O, Bird CP, Blakey S, Bray-Allen S, Brook J, Brown AJ, Brown JY, Burford DC, Burrill W, Burton J, Carder C, Carter NP, Chapman JC, Clark SY, Clark G, Clee CM, Clegg S, Cobley V, Collier RE, Collins JE, Colman LK, Corby NR, Coville GJ, Culley KM, Dhami P, Davies J, Dunn M, Earthrowl ME, Ellington AE, Evans KA, Faulkner L, Francis MD, Frankish A, Frankland J, French L, Garner P, Garnett J, Ghori MJ, Gilby LM, Gillson CJ, Glithero RJ, Grafham DV, Grant M, Gribble S, Griffiths C, Griffiths M, Hall R, Halls KS, Hammond S, Harley JL, Hart EA, Heath PD, Heathcott R, Holmes SJ, Howden PJ, Howe KL, Howell GR, Huckle E, Humphray SJ, Humphries MD, Hunt AR, Johnson CM, Joy AA, Kay M, Keenan SJ, Kimberley AM, King A, Laird GK, Langford C, Lawlor S, Leongamornlert DA, Leversha M, Lloyd CR, Lloyd DM, Loveland JE, Lovell J, Martin S, Mashreghi-Mohammadi M, Maslen GL, Matthews L, McCann OT, McLaren SJ, McLay K, McMurray A, Moore MJ, Mullikin JC, Niblett D, Nickerson T, Novik KL, Oliver K, Overton-Larty EK, Parker A, Patel R, Pearce AV, Peck AI, Phillimore B, Phillips S, Plumb RW, Porter KM, Ramsey Y, Ranby SA, Rice CM, Ross MT, Searle SM, Sehra HK, Sheridan E, Skuce CD, Smith S, Smith M, Spraggon L, Squares SL, Steward CA, Sycamore N, Tamlyn-Hall G, Tester J, Theaker AJ, Thomas DW, Thorpe A, Tracey A, Tromans

- A, Tubby B, Wall M, Wallis JM, West AP, White SS, Whitehead SL, Whittaker H, Wild A, Willey DJ, Wilmer TE, Wood JM, Wray PW, Wyatt JC, Young L, Younger RM, Bentley DR, Coulson A, Durbin R, Hubbard T, Sulston JE, Dunham I, Rogers J, Beck S, The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*. 2003 Oct 23;425(6960):805-11.
- Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jul;15(7):482-96. doi: 10.1038/nrm3823.
- Nagley P, Wei YH. Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends Genet*. 1998 Dec;14(12):513-7.
- Naumova E, Ivanova M, Pawelec G. Immunogenetics of ageing. *Int J Immunogenet*. 2011 Oct;38(5):373-81. doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.01022.x. Epub 2011 Jul 5.
- Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov 11;11(12):823-36. doi: 10.1038/nri3084.
- Nohara K, Baba T, Murai H, Kobayashi Y, Suzuki T, Tateishi Y, Matsumoto M, Nishimura N, Sano T. Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner. *Arch Toxicol*. 2011 Jun;85(6):653-61. doi: 10.1007/s00204-010-0611-z. Epub 2010 Oct 27.
- O'Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Oct;17(10):1218-25. doi: 10.1038/nsmb.1897. Epub 2010 Oct 3.
- Otani J, Arita K, Kato T, Kinoshita M, Kimura H, Suetake I, Tajima S, Ariyoshi M, Shirakawa M. Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl-CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4. *J Biol Chem*. 2013 Mar 1;288(9):6351-62. doi: 10.1074/jbc.M112.431098. Epub 2013 Jan 10.
- Pera A, Campos C, López N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, Solana R. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*. 2015 May 18. pii: S0378-5122(15)00675-1. doi: 10.1016/j.maturitas.2015.05.004. [Epub ahead of print]
- Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene*. 2011 Jul 14;30(28):3105-26. doi: 10.1038/onc.2011.45. Epub 2011 Mar 28.
- Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Apr 15;14(8):1551-85. doi: 10.1089/ars.2010.3228. Epub 2011 Jan 8.

- Pujadas E, Feinberg AP. Regulated noise in the epigenetic landscape of development and disease. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1123-31. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.045.
- Radosevich M, Ono SJ. Novel mechanisms of class II major histocompatibility complex gene regulation. *Immunol Res*. 2003;27(1):85-106.
- Ramos PS, Langefeld CD, Bera LA, Gaffney PM, Noble JA, Moser KL. 2009. Variation in the ATP-binding cassette transporter 2 gene is a separate risk factor for systemic lupus erythematosus within the MHC. *Genes Immun* 10(4):350-5.
- Reboul CF, Meyer GR, Porebski BT, Borg NA, Buckle AM. 2012. Epitope flexibility and dynamic footprint revealed by molecular dynamics of a pMHC-TCR complex. *PLoS Comput Biol* 8(3):e1002404.
- Rice JC, Allis CD. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Jun;13(3):263-73.
- Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*. 2003 May 8;423(6936):145-50.
- Rizvi SM, Del Cid N, Lybarger L, Raghavan M. Distinct functions for the glycans of tapasin and heavy chains in the assembly of MHC class I molecules. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2309-20. doi: 10.4049/jimmunol.1002959. Epub 2011 Jan 24.
- Rizvi SM, Raghavan M. Mechanisms of function of tapasin, a critical major histocompatibility complex class I assembly factor. *Traffic*. 2010 Mar;11(3):332-47. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.01025.x. Epub 2009 Dec 3.
- Robinson J, Mistry K, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SGE: The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*. 2011 39 Suppl 1:D1171-6
- Rougemaille M, Braun S, Coyle S, Dumesic PA, Garcia JF, Isaac RS, Libri D, Narlikar GJ, Madhani HD. Ers1 links HP1 to RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 10;109(28):11258-63. doi: 10.1073/pnas.1204947109. Epub 2012 Jun 25
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 ISBN 978-0879693091.
- Sasai N, Nakao M, Defossez PA. Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res*. 2010 Aug;38(15):5015-22. doi: 10.1093/nar/gkq280. Epub 2010 Apr 19.
- Sciandrello G, Caradonna F, Mauro M, Barbata G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis*. 2004 Mar;25(3):413-7. Epub 2003 Nov 21.

- Segal E, Widom J. What controls nucleosome positions? *Trends Genet.* 2009 Aug;25(8):335-43. doi: 10.1016/j.tig.2009.06.002. Epub 2009 Jul 10.
- Seguín-Estévez Q, De Palma R, Krawczyk M, Leimgruber E, Villard J, Picard C, Tagliamacco A, Abbate G, Gorski J, Nocera A, Reith W. The transcription factor RFX protects MHC class II genes against epigenetic silencing by DNA methylation. *J Immunol.* 2009 Aug 15;183(4):2545-53. doi: 10.4049/jimmunol.0900376. Epub 2009 Jul 20.
- Schulze MS, Wuchterpfennig KW. The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol.* 2012 Feb;24(1):105-11. doi: 10.1016/j.coi.2011.11.004. Epub 2011 Dec 2.
- Schulze MS, Wuchterpfennig KW. The mechanism of HLA-DM induced peptide exchange in the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol.* 2012 Feb;24(1):105-11. doi: 10.1016/j.coi.2011.11.004. Epub 2011 Dec 2.
- Sidler C, Wóycicki R, Illytskyy Y, Metz G, Kovalchuk I, Kovalchuk O. Immunosenescence is associated with altered gene expression and epigenetic regulation in primary and secondary immune organs. *Front Genet.* 2013 Oct 18;4:211. doi: 10.3389/fgene.2013.00211. eCollection 2013.
- Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 2003 Nov;19(11):629-39.
- Song J, Rechkoblit O, Bestor TH, Patel DJ. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science.* 2011 Feb 25;331(6020):1036-40. doi: 10.1126/science.1195380. Epub 2010 Dec 16.
- Song J, Teplova M, Ishibe-Murakami S, Patel DJ. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science.* 2012 Feb 10;335(6069):709-12. doi: 10.1126/science.1214453.
- Spurgin LG, Richardson DS. How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proc Biol Sci.* 2010 Apr 7;277(1684):979-88. doi: 10.1098/rspb.2009.2084. Epub 2010 Jan 13.
- Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, Suchiman HE, Slagboom PE, Boomsma DI, Heijmans BT. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell.* 2012 Aug;11(4):694-703. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00835.x. Epub 2012 Jun 4.
- Tan Q, Christiansen L, Thomassen M, Kruse TA, Christensen K. Twins for epigenetic studies of human aging and development. *Ageing Res Rev.* 2013 Jan;12(1):182-7. doi: 10.1016/j.arr.2012.06.004. Epub 2012 Jun 29.

- Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J. Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell Metab.* 2010 Oct 6;12(4):321-7. doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.004.
- Ting JP, Trowsdale J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S21-33.
- Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med.* 2008 Feb;263(2):167-78. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01905.x.
- Turan N, Katari S, Coutifaris C, Sapienza C. Explaining inter-individual variability in phenotype: is epigenetics up to the challenge? *Epigenetics.* 2010 Jan 1;5(1):16-9. Epub 2010 Jan 6.
- Turner BM. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays.* 2000 Sep;22(9):836-45.
- Ujvari B, Belov K. Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology. *Int J Mol Sci.* 2011;12(8):5168-86. doi: 10.3390/ijms12085168. Epub 2011 Aug 15.
- Vadasz Z, Haj T, Kessel A, Toubi E. Age-related autoimmunity. *BMC Med.* 2013 Apr 4;11:94. doi: 10.1186/1741-7015-11-94.
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):40-8. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.02.004. Epub 2008 Feb 29.
- van den Elsen PJ. Expression regulation of major histocompatibility complex class I and class II encoding genes. *Front Immunol.* 2011;2:48. doi: 10.3389/fimmu.2011.00048. Epub 2011 Oct 4.
- Vilchez D, Simic MS, Dillin A. Proteostasis and aging of stem cells. *Trends Cell Biol.* 2014 Mar;24(3):161-70. doi: 10.1016/j.tcb.2013.09.002. Epub 2013 Oct 3.
- Waterstrat A, Van Zant G. Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Immunol.* 2009 Aug;21(4):408-13. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.002. Epub 2009 Jun 6.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* 2007 Apr;39(4):457-66. Epub 2007 Mar 4.
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int.* 2009 Nov;22(11):1041-50. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x. Epub 2009 Jul 16.
- Wenisch C, Patruta S, Daxböck F, Krause R, Hörl W. Effect of age on human neutrophil function. *J Leukoc Biol.* 2000 Jan;67(1):40-5.
- Wessels I, Jansen J, Rink L, Uciechowski P. Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *ScientificWorldJournal.* 2010 Jan 21;10:145-60. doi: 10.1100/tsw.2010.14.

- Wilson RC, Doudna JA. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys.* 2013;42:217-39. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130404.
- Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J.* 1998 Aug;12(11):949-57.
- Wong C, Goldstein DR. Impact of aging on antigen presentation cell function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 2013 Aug;25(4):535-41. doi: 10.1016/j.coi.2013.05.016. Epub 2013 Jun 24.
- Woodcock CL, Ghosh RP. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 May;2(5):a000596. doi: 10.1101/cshperspect.a000596. Epub 2010 Apr 7.
- Xing Y, Hogquist KA, T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Jun 1;4(6). pii: a006957. doi: 10.1101/cshperspect.a006957.
- Zee BM, Levin RS, Xu B, LeRoy G, Wingreen NS, Garcia BA. In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J Biol Chem.* 2010 Jan 29;285(5):3341-50. doi: 10.1074/jbc.M109.063784. Epub 2009 Nov 23.
- Zeisel SH. Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. *Mutat Res.* 2012 May 1;733(1-2):34-8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.10.008. Epub 2011 Oct 20.
- Zeisel SH. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2009 May;89(5):1488S-1493S. doi: 10.3945/ajcn.2009.27113B. Epub 2009 Mar 4.
- Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Mar;20(3):259-66. doi: 10.1038/nsmb.2470.
- Zhang D, Li S, Tan Q, Pang Z. Twin-based DNA methylation analysis takes the center stage of studies of human complex diseases. *J Genet Genomics.* 2012 Nov 20;39(11):581-6. doi: 10.1016/j.jgg.2012.07.012. Epub 2012 Sep 22.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell.* 2004 Jul 9;118(1):57-68.
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 1999 Aug 1;13(15):1924-35.
- Zhou Y, Lu Q. DNA methylation in T cells from idiopathic lupus and drug-induced lupus patients. *Autoimmun Rev.* 2008 May;7(5):376-83. doi: 10.1016/j.autrev.2008.03.003. Epub 2008 Apr 4.

Internetové zdroje:

University of Cambridge

http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/murrell.php staženo 11.2.2013

National Center for Biotechnology Information, Gene database

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>, staženo 8.1.2013

Annual Reviews

<http://www.annualreviews.org/>, staženo 20.2.2012

HLA Nomenclature

<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, staženo 18.1.2013

www.promega.com 6.9.2014